

RNAi-Untersuchungen und Überexpression von Genen der Rosmarinsäurebiosynthese

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Stephanie Hücherig
aus Hof**

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 26. Januar 2010 angenommen.

Erstgutachterin: Prof. Dr. M. Petersen
Zweitgutachterin: PD Dr. E. Fuß

Tag der mündlichen Prüfung am 27. Januar 2010

“Not everything that can be counted counts,
and not everything that counts can be counted.”

Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. RNA-Interferenz	1
1.1.1. Entdeckung der RNAi	1
1.1.2. Mechanismus der RNAi	2
1.1.3. RNAi <i>in vivo</i>	4
1.1.4. Anwendungen der RNAi	4
1.2. Überexpression mit dem CaMV 35S-Promotor	4
1.3. Agrobakterien	5
1.3.1. Allgemeine Einführung zu Agrobakterien	5
1.3.2. Plasmide der Agrobakterien	5
1.3.3. Molekularer Mechanismus der Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien	8
1.3.5. Anwendungen der Hairy Roots	12
1.4. Rosmarinsäurebiosynthese	12
1.4.1. Rosmarinsäure und ihr Vorkommen	12
1.4.2. Biosynthese der Rosmarinsäure	13
1.4.3. HPPR	14
1.4.4. RAS	18
1.5. HPR und Photorespiration	21
1.6. <i>Coleus blumei</i>	23
1.7. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	24
2. Methoden	26
2.1. Erstellung von RNAi- und Überexpressionskonstrukten	26
2.1.1. Die Vektoren pHANNIBAL und pART27 und die Auswahl der zu klonierenden Sequenzen	26
2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für Klonierungen	31
2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese	32
2.1.4. Gelextraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren	33
2.1.5. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	33
2.1.6. Dephosphorylieren von aufgeschnittenen Vektoren	34
2.1.7. Ligationen	34
2.1.8. Transformation von <i>E. coli</i>	35
2.1.9. Ansetzen von Übernachtskulturen	35
2.1.10. Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen	36
2.1.11. Plasmid-Präparation (Minipräp)	36
2.1.12. QIAprep Plasmid-Präparation	37
2.1.13. Sequenzierung	38
2.2. Transformation von Pflanzenmaterial mit Hilfe von <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	37
2.2.1 Transformation von <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	37
2.2.2. <i>Coleus blumei</i> -Pflanzenkulturen	38
2.2.3. Transformation von <i>Coleus blumei</i> -Blättern mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	38
2.3. Molekularbiologische Analyse der transgenen Hairy Roots	40
2.3.1. DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial für PCR	40
2.3.2. Kontroll-PCRs auf verschiedene Zielsequenzen	41
2.3.3. RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial	42
2.3.4. cDNA-Synthese	42
2.3.5. Semiquantitative PCR auf cDNA	43

<u>2.4. Southern Blot</u>	44
<u>2.4.1. DNA-Extraktion für Southern Blot</u>	44
<u>2.4.2. Restriktionsverdau der genomischen DNA</u>	45
<u>2.4.3. Fällung der verdauten genomischen DNA</u>	45
<u>2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese und Blotten der DNA auf eine Nylonmembran</u>	46
<u>2.4.5. Synthese von Digoxigenin-markierten Sonden über PCR</u>	47
<u>2.4.6. Hybridisierung der Membran mit der Digoxigenin-markierten Sonde</u>	47
<u>2.4.7. Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde</u>	48
<u>2.5. Charakterisierung der transgenen Hairy Roots</u>	48
<u>2.5.1. Proteinrohextrakt aus Pflanzenmaterial</u>	49
<u>2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford-Reagenz</u>	49
<u>2.5.3. Enzymtests: allgemeine Angaben</u>	50
<u>2.5.4. TAT-Enzymtest</u>	50
<u>2.5.5. PAL-Enzymtest</u>	51
<u>2.5.6. HPPR-Enzymtest</u>	51
<u>2.5.7. RAS-Enzymtest</u>	51
<u>2.5.8. Synthese von Caffeoyl-CoA</u>	52
<u>2.5.9. Extraktion von Rosmarinsäure</u>	53
<u>2.5.10. Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen</u>	53
<u>2.6. Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der rekombinanten Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) aus <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	54
<u>2.6.1. Expression des Proteins in <i>E. coli</i></u>	54
<u>2.6.2. Aufschluss der Bakterien</u>	54
<u>2.6.3. Aufreinigung des Proteins über His-Tag und Metallchelat-Chromatografie</u>	55
<u>2.6.4. Dialyse zur Umpufferung der Proteinlösung nach der Aufreinigung</u>	55
<u>2.6.5. HPR-Enzymtest</u>	56
<u>2.7. Medien</u>	57
<u>2.7.1. CB2OH</u>	57
<u>2.7.2. YMB</u>	58
<u>2.7.3. LB</u>	58
3. Materialien	59
<u>3.1. Bakterienstämme</u>	59
<u>3.2. Pflanzenmaterial</u>	59
<u>3.3. Primer</u>	59
<u>3.4. Chemikalien</u>	60
<u>3.5. Geräte</u>	61
<u>3.6. Vektoren</u>	61
<u>3.7. Kits für molekularbiologische Arbeiten</u>	62
<u>3.8. Enzyme, Proteine</u>	62
<u>3.9. Sonstiges</u>	62
4. Ergebnisse	63
<u>4.1. RNAi- und Überexpressionskonstrukte</u>	63
<u>4.1.1. RNAi-Konstrukt der HPPR</u>	63
<u>4.1.2. RNAi-Konstrukt der RAS</u>	66
<u>4.1.3. Überexpressionskonstrukt der HPPR</u>	68
<u>4.1.4. Überexpressionskonstrukt der RAS</u>	70
<u>4.2. Ermittlung der besten Kombination von <i>Coleus blumei</i>-Linien mit verschiedenen <i>Agrobacterium rhizogenes</i>-Stämmen</u>	72
<u>4.2.1. Transformationsraten und stabile Flüssigkulturen für weitere Verwendung</u>	72

<u>4.2.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Hairy Root-Kulturen</u>	74
4.2.2.1. Test auf die Abwesenheit von Agrobakterien	74
4.2.2.2. Test auf Anwesenheit des HPPR-RNAi-Konstrukts	74
4.2.2.3. Test auf agrobakterienbedingte Transformation	75
4.2.2.4. Bestimmung der HPPR-mRNA-Level in den verschiedenen Hairy Root-Linien	76
<u>4.2.3. Vergleich der Rosmarinsäuregehalte in den AHR-Linien und den HPPR RNAi-Linien</u>	76
<u>4.3. RNAi und Überexpression von HPPR und RAS</u>	77
<u>4.3.1. Transformationsraten und erhaltene stabile Kulturen für RNAi, Überexpression und Kontrollen</u>	77
<u>4.3.2. Molekularbiologische Untersuchungen der RNAi- und Überexpressions-Hairy Roots und deren Kontrollen</u>	78
4.3.2.1. Test auf Anwesenheit der RNAi- und Überexpressionskonstrukte mit 35S-Primern	79
4.3.2.2. Test auf Anwesenheit der RNAi- und Überexpressionskonstrukte mit <i>nptII</i> -Primern	79
4.3.2.3. Test auf die Abwesenheit von Agrobakterien	80
4.3.2.4. Test auf agrobakterienbedingte Transformation	80
4.3.2.5. Bestimmung der mRNA-Level von RAS, HPPR und HPR1	81
4.3.2.6. Bestimmung der Transformationsereignisse durch Southern Blot	83
<u>4.3.3. Kulturcharakterisierung einzelner Hairy Root-Linien</u>	85
4.3.3.1. Beobachtung der Medienparameter	85
4.3.3.2. Bestimmung von Frisch- und Trockengewichten	87
4.3.3.3. Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts	88
4.3.3.4. Enzymaktivitäten von PAL, TAT und RAS	88
4.3.3.5. Bestimmung der m-RNA-Level von HPPR und RAS während der Kulturperiode	90
<u>4.3.4. Untersuchung der transgenen Hairy Root-Linien im Vergleich</u>	90
4.3.4.1. Rosmarinsäuregehalte	91
4.3.4.2. TAT-Aktivität	92
4.3.4.3. PAL-Aktivität	93
4.3.4.4. HPPR-Aktivität	94
4.3.4.5. RAS-Aktivität	95
<u>4.3.5. Akkumulation von Zwischenprodukten der Rosmarinsäurebiosynthese</u>	96
<u>4.3.6. Fütterungsexperimente</u>	97
<u>4.4. Charakterisierung der rekombinanten Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) aus <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	98
<u>4.4.1. K_m-Werte für das Cosubstrat NADPH</u>	99
4.4.1.1. K_m -Wert für NADPH mit dem Substrat Hydroxypyruvat	99
4.4.1.2. K_m -Wert für NADPH mit dem Substrat Pyruvat	100
<u>4.4.2. K_m-Werte für das Cosubstrat NADH</u>	101
4.4.2.1. K_m -Wert für NADH mit dem Substrat Hydroxypyruvat	101
4.4.2.2. K_m -Wert für NADH mit dem Substrat Pyruvat	102
<u>4.4.3. K_m-Werte für Hydroxypyruvat, Pyruvat und Glyoxylat mit dem Cosubstrat NADPH</u>	103
4.4.3.1. K_m -Wert für Hydroxypyruvat mit dem Cosubstrat NADPH	103
4.4.3.2. K_m -Wert für Pyruvat mit dem Cosubstrat NADPH	104
4.4.3.3. K_m -Wert für Glyoxylat mit dem Cosubstrat NADPH	105
<u>4.4.4. K_m-Werte für Hydroxypyruvat und Pyruvat mit dem Cosubstrat NADH</u>	106
4.4.4.1. K_m -Wert für Hydroxypyruvat mit dem Cosubstrat NADH	106
4.4.4.2. K_m -Wert für Pyruvat für das Cosubstrat NADH	107
<u>4.4.5. Temperatur-Optimum</u>	108
<u>4.4.6. pH-Optimum</u>	109

<u>4.4.7. Zusammenfassung der Charakterisierungsdaten</u>	110
<u>4.5. Genomische Faktoren der HPPR aus <i>Coleus blumei</i></u>	111
5. Diskussion	114
<u>5.1. Herstellung und Analyse der RNAi- und Überexpressionskonstrukte</u>	114
<u>5.2. Test-Transformationen</u>	115
<u>5.3. RNAi- und Überexpressionsuntersuchungen</u>	118
<u>5.3.1. Molekularbiologische Untersuchungen der Hairy Root-Linien</u>	118
<u>5.3.2. Kulturcharakterisierung zur Bestimmung eines Erntezeitpunkts</u>	120
<u>5.3.3. Rosmarinsäuregehalte der verschiedenen Hairy Root-Linien</u>	121
<u>5.3.4. TAT-Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien</u>	122
<u>5.3.5. PAL-Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien</u>	124
<u>5.3.6. HPPR- Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien</u>	125
<u>5.3.7. RAS-Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien</u>	128
<u>5.4. Fütterung von Vorstufen und mögliche Akkumulation von Zwischenstufen</u>	130
<u>5.5. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aus HPPR und RAS RNAi- und Überexpressionsexperimenten</u>	130
<u>5.6. Charakterisierung der rekombinanten cytosolischen Hydroxypyruvat Reduktase (HPR2) aus <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	131
<u>5.7. Ausblick</u>	136
6. Zusammenfassung	139
7. Summary	141
8. Literaturverzeichnis	143
9. Anhang	152
<u>9.1. Abkürzungen</u>	152
<u>9.2. Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleotide</u>	153
<u>9.3. Vektorkarten</u>	154
Veröffentlichungen	156
Danksagung	157
Lebenslauf	158
Erklärung	159

1. Einleitung

1.1. RNA-Interferenz

1.1.1. Entdeckung der RNAi

RNA-Interferenz (RNAi), auch RNA-Silencing genannt, ist ein bei Eukaryoten natürlich vorkommender Prozess. Er dient der Genregulation und der Virenabwehr (Napoli et al., 1990; Romano und Macino, 1992; Lee et al., 1993). Dabei wird Genexpression RNA-basierend und sequenzspezifisch unterdrückt. Die Gensuppression kann transkriptional, post-transkriptional (deshalb auch PTGS = „posttranscriptional gene silencing“) oder auch translational erfolgen.

Die Effekte der RNAi wurden erstmals an Pflanzen beobachtet, als Napoli et al. (1990) versuchten, durch die Überexpression der Chalconsynthase die Blütenfarbe von *Petunia hybrida* L. zu verstärken. Es trat jedoch der gegenteilige Effekt auf, und die Blüten waren schwächer gefärbt, teils sogar farblos. Sie nannten den Effekt Cosuppression. Weitere Untersuchungen zeigten, dass ein verstärkter Abbau der mRNA der Grund dafür war, dass letztendlich kaum funktionsfähiges Protein translatiert werden konnte (Blokland et al., 1994). Fire et al. fanden 1998 bei Untersuchungen an *Caenorhabditis elegans* heraus, dass doppelsträngige RNA die Ursache für das PTGS ist. Sie nannten den Prozess aufgrund des verursachenden Moleküls RNAi und erhielten für diese Entdeckung den Nobelpreis (Fire et al., 1998). Dass doppelsträngige RNA bei Pflanzen denselben Effekt hat, wurde erstmals von Waterhouse et al. (1998) beschrieben.

1.1.2. Mechanismus der RNAi

Obwohl man in Pflanzen als auch in Tieren den RNAi-Mechanismus vorfindet, unterscheiden sich die Mechanismen etwas voneinander, besitzen jedoch die gleichen oder homologe Schlüsselproteine. Selbst in Prokaryoten existieren RNAi-ähnliche Abwehrsysteme die zumindest funktionell mit der eukaryotischen RNAi vergleichbar sind. RNAi scheint jedoch in eukaryotischen, einzelligen Organismen nicht essentiell zu sein, da es durchaus Organismen gibt, die keine RNAi aufweisen (Cerutti und Casas-Mollano, 2006). Bei Vielzellern hingegen ist RNAi auch an der Regulation der Ontogenese beteiligt, und eine Fehlfunktion in der RNAi-Maschinerie hat meist letale Folgen (Bernstein et al., 2003). Die eukaryotischen Schlüssel-Proteine der RNAi haben meist einen prokaryotischen Ursprung in DNA-Reparatur und RNA-Bearbeitung und wurden einer neuen Funktion zugeführt. Vergleicht man die eukaryotischen Gene untereinander, weisen sie einen hohen Grad an konservierten DNA-Bereichen auf.

Der RNAi-Vorgang wird durch die Typ-III-Ribonuclease Dicer eingeleitet, welche doppelsträngige RNA (dsRNA) in Stücke von 21 bp Länge mit einem zwei Basenpaar 3'-Überhang schneidet. Diese kleinen dsRNA-Stücke werden als siRNA bezeichnet (small interfering RNA). Ein Strang der dsRNA wird in den Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingegliedert und dient als Template zur spezifischen Erkennung von mRNA-Sequenzen. Die durch Basenpaarung gebundene Ziel-mRNA wird durch die Argonaute-Untereinheit des RISC gespalten. Die Teilstücke werden dann von RNasen abgebaut. Auf diese Weise kann die Verbreitung von RNA-Viren und Retrotransposons verhindert werden (siehe Abb. 1.1.). Dient die RNAi der Genregulation, wird nicht-kodierende RNA aus dem Genom transkribiert. Diese RNA kodiert kein Protein sondern wird durch verschiedene Enzyme prozessiert und gelangt schließlich als Haarnadelstruktur von etwa 80 bp mit doppelsträngigen Bereichen in das Cytoplasma (pre-miRNA). Dort wird der Doppelstrangbereich von Dicer gespalten und man erhält die miRNAs (microRNAs). Der weitere Verlauf ist dem der siRNAs ähnlich. Stimmt die Bindesequenz nur teilweise überein, wird die Translation eines Zielgens gehemmt. Stimmen die Sequenzen genau überein, wird die komplementäre mRNA gespalten. Beides führt zu einer Suppression der Zielgene, wie bei der siRNA.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft, werden miRNAs und siRNAs von verschiedenen Dicer und Argonaute-Proteinen verarbeitet. Desweiteren ist die Paarung der miRNAs nicht immer exakt und dient daher meist der Regulation von verschiedenen Sequenz-ähnlichen mRNAs. siRNAs hingegen paaren exakt mit ihrer Ziel-RNA und sind daher für die Suppression eines bestimmten Gens spezifisch.

1.1.3. RNAi *in vivo*

Seit Entdeckung der RNAi wurde herausgefunden, dass dieser Prozess an diversen biologischen Vorgängen beteiligt ist. RNAi spielt beispielsweise als Regulator der Genexpression in der Ontogenese eine Rolle, sowohl bei Pflanzen (Jones-Rhoades et al., 2006) als auch bei Tieren (Lee et al., 1993). Zusätzlich kann RNAi eine Rolle bei Abwehrreaktionen besonders von Pflanzen spielen (Ding et al., 2004). Sowohl virale als auch bakterielle Erreger können auf diese Weise unschädlich gemacht werden. Die Reaktion ist jedoch immer hoch spezifisch für einen bestimmten Erreger und hängt von der Pflanzenart und eventuell einer leichten Erstinfektion ab.

Möglicherweise spielt RNAi auch eine Rolle bei der Verbreitung von Transposons, was zusätzlich auf die Funktion der Virenabwehr deutet (Ghildiyal et al., 2008), da z.B. Retrotransposons in vielen Fällen ihren Ursprung in Retroviren haben (Janning und Knust, 2004).

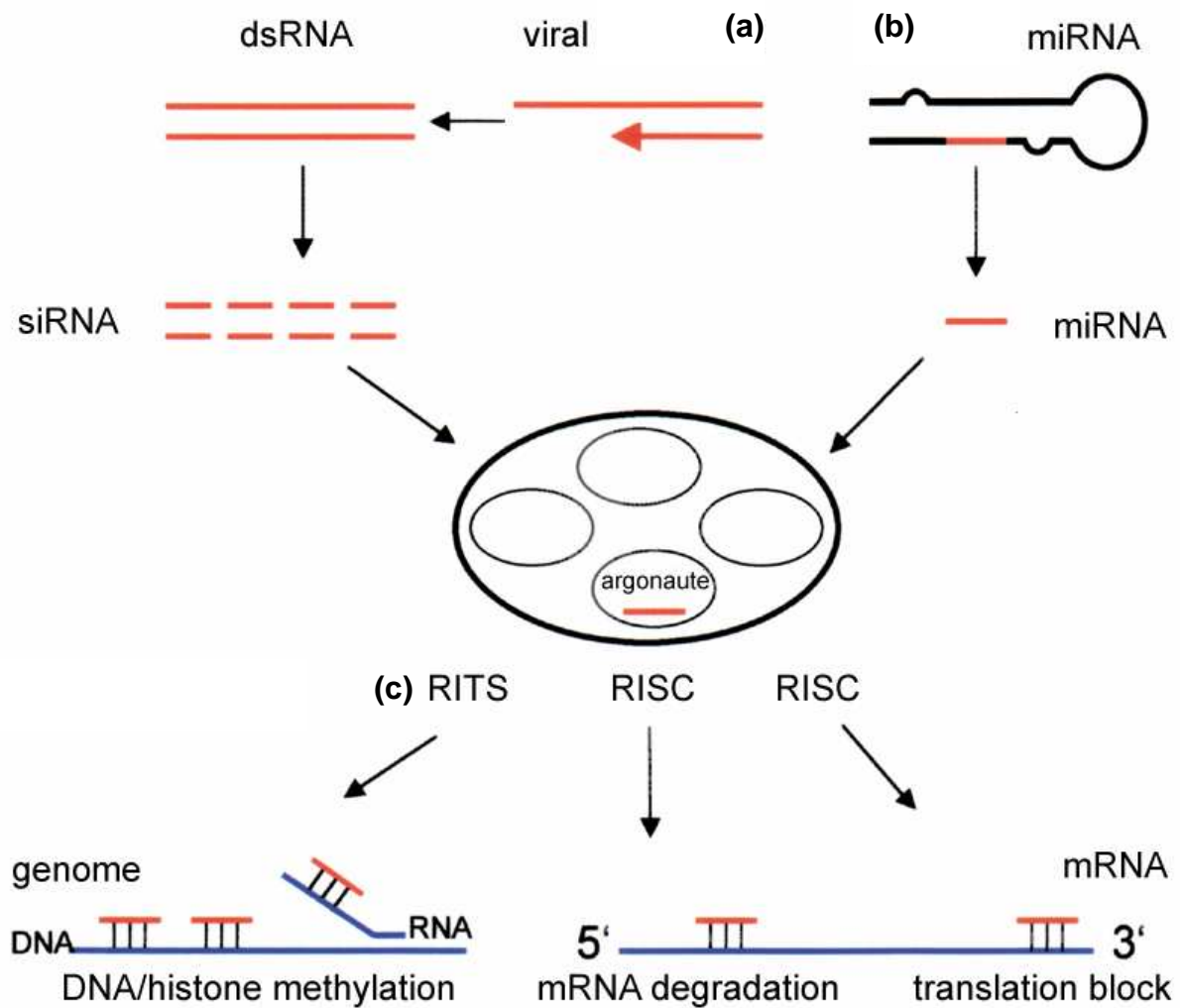


Abb. 1.1.: Graphische Zusammenfassung der verschiedenen RNAi-Prozesse **(a)** Virusabwehr durch siRNA; **(b)** Genregulation durch miRNA; **(c)** prätranskriptionale Genregulation durch einen endogenen RNAi-ähnlichen Vorgang genannt RITS (RNA-induced transcriptional silencing), der durch Methylierungen auf genomischer Ebene in die Genregulation eingreift und auf siRNAs zurückgeht (aus Verdell et al., 2004)

RNAi ist indirekt auch an der Insektenabwehr in Pflanzen beteiligt, da gezeigt werden konnte, dass RNAi bei der Regulierung von Phytohormon-Signalen wie Jasmonsäure eine Rolle spielt. Jasmonsäure ist maßgeblich an der Abwehr von Insekten beteiligt. Auch abiotischer Stress bei Pflanzen kann bestimmte miRNAs induzieren, die daher vermutlich an diversen Stressantworten der Pflanzen beteiligt sind (Sunkar und Zhu, 2004).

RNAi-Effekte können sich auch in Geweben vom Ursprungsort ausbreiten und in entfernten Geweben PTGS hervorrufen (Palauqui et al., 1996). Das geht sogar so weit, dass PTGS an Nachkommen weitergegeben werden kann (Voinnet und Baulcombe, 1997).

Abschließend ist hier zu sagen, dass bis jetzt nur ein kleiner Teil dessen bekannt ist, woran RNAi beteiligt ist. Vermuten lassen dies Studien, in denen eine große Menge an siRNAs aus *Arabidopsis thaliana* sequenziert wurden: nur einem Bruchteil dieser siRNAs konnten Zielgene zugeordnet werden (Lu et al., 2005).

1.1.4. Anwendungen der RNAi

Die RNAi findet eine breite Anwendung in der Wissenschaft. Sie wird in Knockdown-Experimenten eingesetzt, um Genfunktionen zu überprüfen. Auch in der funktionellen Genomik und im Metabolic Engineering findet RNAi ihren Einsatz. Zur Verbesserung von Nutzpflanzen wird RNAi ebenfalls eingesetzt. Man möchte damit die Insektenabwehr verbessern, toxische Eigenschaften gegebenenfalls verringern oder den Nährwert von Nahrungsmitteln erhöhen. Ein weiteres Ziel ist es, Allergene auszuschalten (Mansoor et al., 2006).

Außerdem erhofft man sich in der Medizin eine Anwendung als Therapie gegen verschiedene Viren wie Hepatitis und HIV (Pan et al. 2009; Singh und Gaur, 2009), gegen Krebs (Lage, 2009) und Erbkrankheiten. Zurzeit befinden sich diese Ansätze noch im Entwicklungsstadium, da ein Einsatz durch unerwünschte off-target Reaktionen der siRNAs erschwert wird und das gezielte Einbringen der RNAs noch ein Problem darstellt (Nguyen et al., 2008).

1.2. Überexpression mit dem CaMV 35S-Promotor

Der CaMV 35S-Promotor wurde 1985 von Odell et al. isoliert. Er ist für die vollständige Transkription der Gene des „Cauliflower Mosaic Virus“ verantwortlich, der hauptsächlich Kreuzblütler wie Rüben, Kohl und Raps befällt. Der 35S-Promotor ist ein in der Wissenschaft viel genutzter konstitutiver Promotor, der von der Pflanze erkannt wird. Da der Promotor konstitutiv ist, ist es der Pflanze nicht möglich, in dessen Regulation einzugreifen. Wird der Promotor bei Transformationen in Pflanzen verwendet, erhält man vor allem in Dikotylen stark erhöhte Genexpressionslevel.

Die Vorteile des CaMV 35S-Promotors sind, dass er in vielen Pflanzengeweben und -arten funktionsfähig ist (Harpster et al. 1988, Benfey et al., 1990). In Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* wurde festgestellt, dass die Expression des Promotors in Blättern am höchsten ist, sonst aber keine extreme Organspezifität aufweist. Eine weitere Steigerung der Expression kann erreicht werden, wenn dem CaMV 35S-Promotor ein Enhancer (Omega Element des Tabak-Mosaik-Virus) (Holtorf et al., 1995) oder eine Teilduplikation des 35S-Promotors beigefügt wird (Kay et al., 1987). Es ist jedoch immer zu berücksichtigen, dass

eine starke Expression nur sinnvoll ist, wenn das exprimierte Gen nicht toxisch für die Pflanze ist oder die Pflanze anderweitig negativ beeinflusst (Chinn und Comai, 1996). Außerdem kann es bei starken Überexpressionen immer wieder zu dem Effekt der Co-Suppression kommen, und man erhält stattdessen einen dem RNAi ähnlichen Effekt (Napoli et al., 1990).

1.3. Agrobakterien

1.3.1. Allgemeine Einführung zu Agrobakterien

Agrobakterien sind gramnegative, peritrich begeißelte Bodenbakterien. Sie gehören der Familie Rhizobiaceae an, die Zuordnung zur Gattung *Agrobacterium* (Farrand et al., 2003) oder zur Gattung *Rhizobium* (Young et al., 2001) wird noch diskutiert. Von besonderer Bedeutung für die wissenschaftliche Forschung sind die Arten *Agrobacterium tumefaciens* (beschrieben von Smith, 1911) und *Agrobacterium rhizogenes* (beschrieben von Riker, 1930). Sie tragen ein Plasmid, das sie dazu befähigt, eigenes genetisches Material auf Pflanzen zu übertragen und dort fest ins Pflanzengenom zu integrieren (Chilton et al., 1977). Dies verursacht in der Pflanze eine lokale Umstellung des Hormonhaushaltes, und daraus resultiert im Fall von *A. tumefaciens* die Krankheit Wurzelhalstumor und im Fall von *A. rhizogenes* die Wurzelhaarkrankheit (Hairy Root disease) (Abb. 1.2.). Zusätzlich werden in diesen induzierten Geweben Opine (Abb. 1.4.) gebildet, die den Agrobakterien als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen. Die Fähigkeit der Bakterien, Gene auf vor allem dicotyle Pflanzen zu transferieren, nutzt man nun gentechnologisch, um ausgewählte Gene oder Genkonstrukte in Pflanzen einzuführen und deren Auswirkungen *in planta* zu untersuchen oder Nutzpflanzen bestimmte erwünschte Eigenschaften zu verleihen (Raven, 2000; Sitte, 2002).

1.3.2. Plasmide der Agrobakterien

Bereits seit Mitte der 1970er Jahre war aufgrund diverser Experimente deutlich, dass Plasmide die Ursache für die Virulenz der Agrobakterien sind. So konnten nicht-virulente Agrobakterienstämme durch Einbringen eines Plasmids Tumore auslösen und umgekehrt verloren virulente Stämme mit ihrem Plasmid die Fähigkeit, Pflanzen zu transformieren. Dabei wird jedoch nicht das vollständige Plasmid übertragen, sondern lediglich etwa 5 %, die sogenannte T-DNA (Transfer-DNA) (zusammengefasst in Chilton et al., 1977).

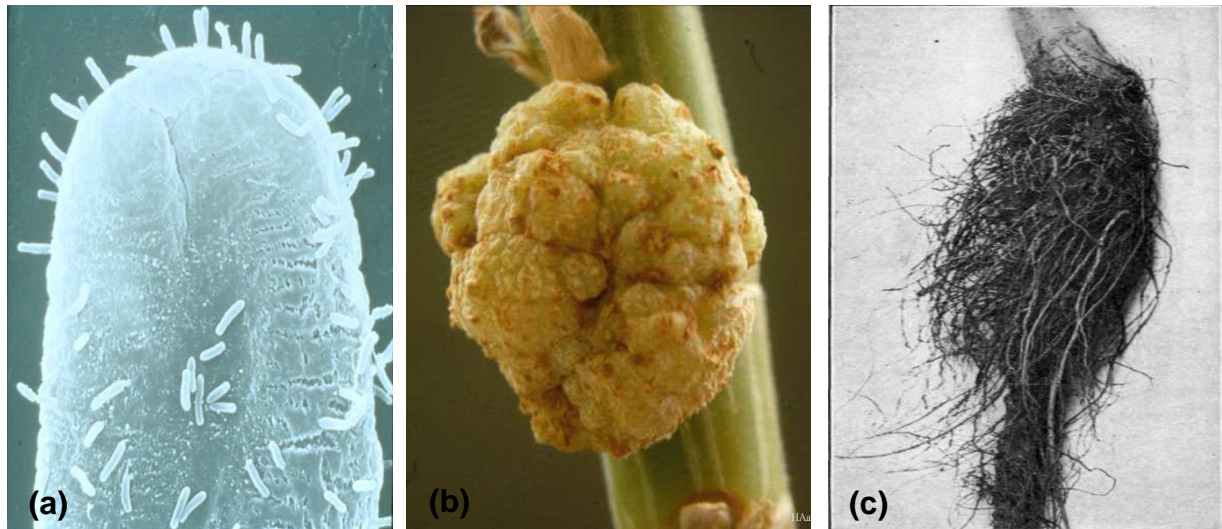


Abb. 1.2.: (a) Pflanzengewebe mit Agrobakterien (Photo: Martha Hawes, University of Arizona); (b) Wurzelhalstumor durch *Agrobacterium tumefaciens* (Abbildung aus <http://biologi.uio.no/plfys/haa/gen/gmo.htm> Halvor Aarnes); (c) Hairy Roots durch *Agrobacterium rhizogenes*; Abbildung aus Smith und Townsend, 1917)

Ti- („tumor inducing“) und Ri- (root inducing) Plasmide sind durchschnittlich etwa 200 kb groß. Im Allgemeinen tragen sie folgende Gene (Abb. 1.3.):

- (1) *tra*-Gene (Transfer-Gene) dienen der Konjugation und dem Plasmid-Austausch mit anderen Agrobakterien (Piper et al., 1993)
 - (2) *vir*-Gene (Virulenz-Gene) sind nötig zum Transfer der T-DNA (Hagiya et al., 1985)
 - (3) Gene für den Opine-Katabolismus (De Greve et al., 1982), zur Nutzung der Opine als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle
 - (4) *ori* (origin of replication) zur Vermehrung des Plasmids in den Agrobakterien (Cook und Farrand, 1992).
 - (5) T-DNA mit den etwa 25 bp langen Transfersequenzen Right Border (RB) und Left Border (LB) (Slightom et al., 1985); Tumorgenese-Gene (*tms* in *A. tumefaciens* und in *A. rhizogenes*; *rol* in *A. rhizogenes*) und Opinsynthese-Gene (z.B. *nos* für Nopalinsynthese).
- Weitere Gene, die zur Bakterium-Pflanzen-Interaktion und für den korrekten Transfer der T-DNA notwendig sind, befinden sich im bakteriellen Genom.

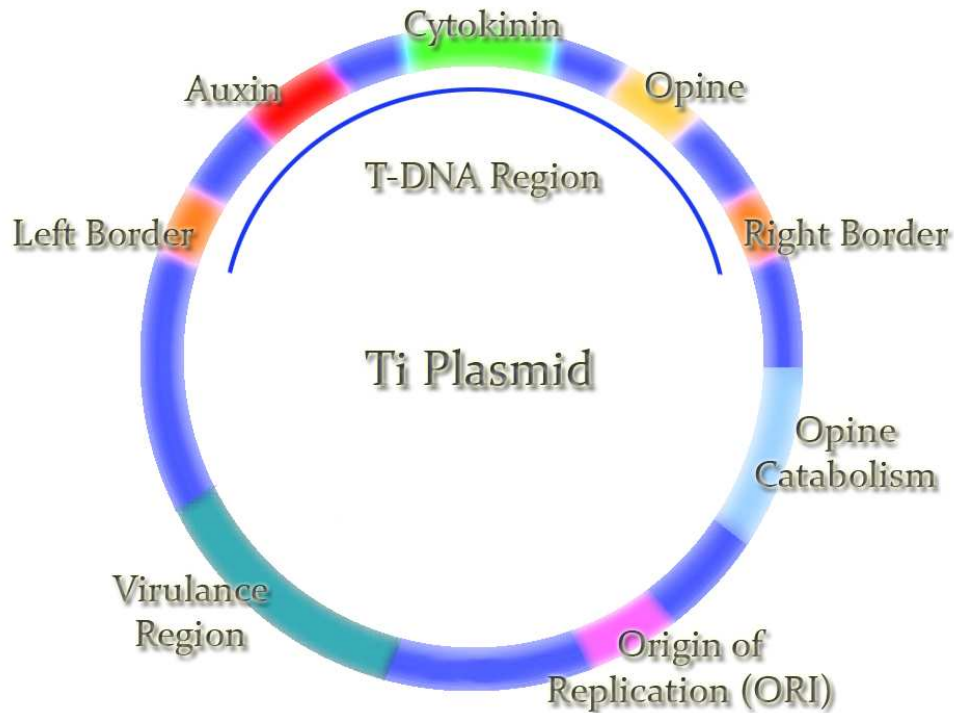


Abb. 1.3.: Schematischer Aufbau eines Ti-Plasmids (Quelle: Wikipedia)

Die Einteilung der Ti- beziehungsweise Ri-Plasmide erfolgt nach den Opinen, die nach der Transformation von den Tumoren gebildet werden. Diese Opine können von den Bakterien durch Enzyme, die auf dem Plasmid kodiert sind, abgebaut werden und dienen den Bakterien als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. Die heute bekannten 30 Opine lassen sich strukturell in zwei große Gruppen einteilen, die Agrocinoeine (Zucker-Phosphodiester) und die Derivate sekundärer Amine (Kondensation von Aminosäure und Ketosäure oder Zucker). Die Amin-Derivate lassen sich wiederum in drei Kategorien einteilen: die Mannityl-Familie, die Nopalin-Familie und die Octopin-Familie. Die bekanntesten Vertreter der Amin-Derivate sind z.B. Octopin (Arginin und Pyruvat) und Nopalin (Arginin und α -Ketoglutarat). Das Opine (selten mehrere Opine), das von einem Tumor produziert wird, ist typisch für eine Agrobakterien-Art, und sowohl Anabolismus als auch Katabolismus sind speziell darauf ausgerichtet. Sind verschiedene Opine in einem Tumor zu finden, liegt dies meist daran, dass in der Natur vorkommende Tumore nicht nur von einem Agrobakterien-Stamm infiziert sind sondern von mehreren. Zusätzlich könne Opine die Konjugation induzieren, wobei das Ti-Plasmid auf nicht-virulente Agrobakterien übertragen wird. Andere Untersuchungen zeigten, dass nicht nur Agrobakterien Opine als Nährstoffquelle nutzen können, sondern auch eine Vielzahl anderer Mikroorganismen, da die Opine vom Tumor ins Erdreich abgegeben werden. Das deutet darauf hin, dass sich andere Organismen die ökologische Nische der

Agrobakterien erobert haben und sich so indirekt die pflanzliche Photosynthese als Energiequelle erschlossen haben (zusammengefasst in Moore et al., 1997).

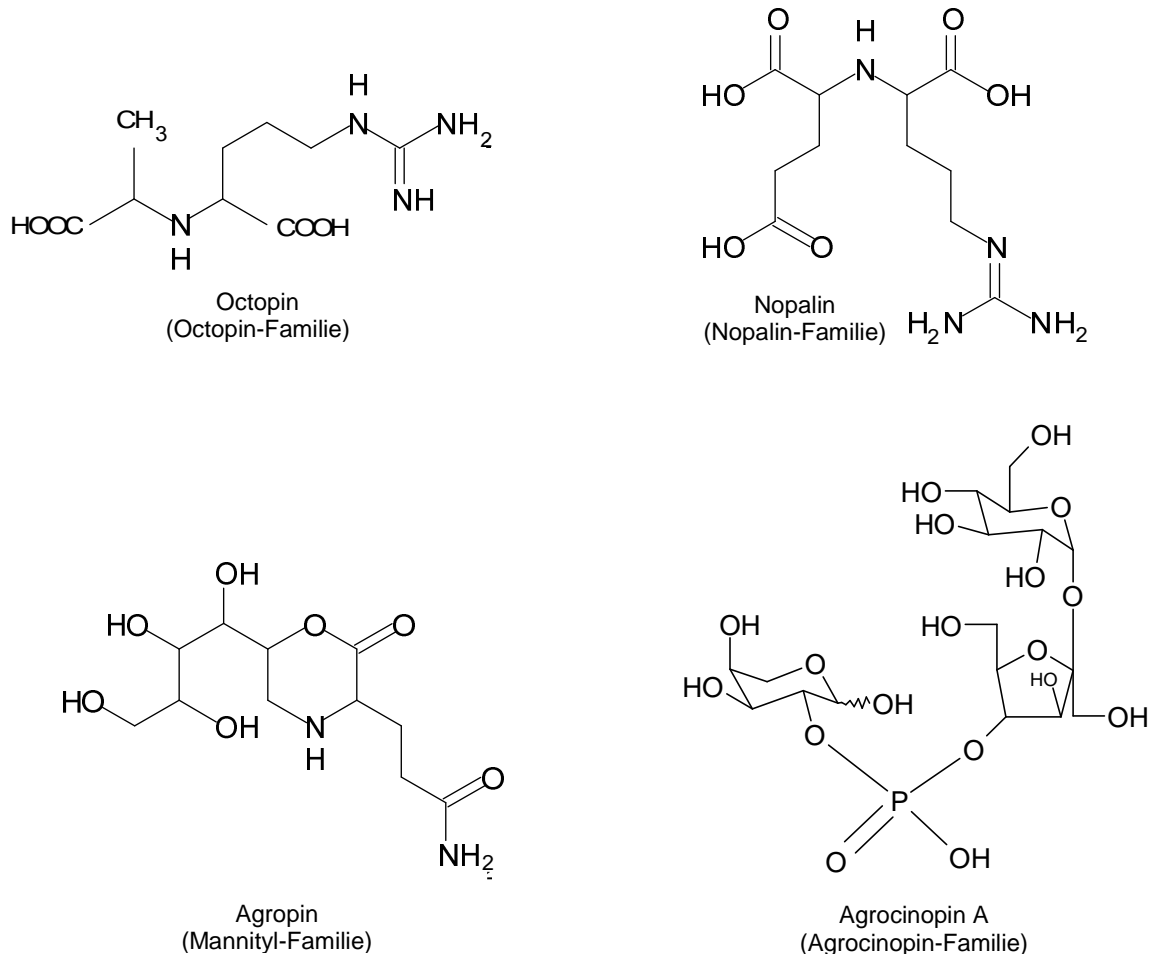


Abb. 1.4.: Strukturformeln verschiedener Opine.

1.3.3. Molekularer Mechanismus der Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien

Die Mechanismen der Agrobakterien-Transformation von Pflanzen ist hauptsächlich an *A. tumefaciens* untersucht worden, verläuft aber bei *A. rhizogenes* ähnlich (Veena und Taylor, 2007) (Abb. 1.5.).

Pflanzen entlassen bei Verwundung Zuckerverbindungen, Aminosäuren und verschiedene phenolische Verbindungen, wie z.B. Acetosyringon, Ferulasäure, Gallussäure oder Vanillin (Reynaerts et al., 2002). Agrobakterien haben dafür Rezeptoren und reagieren mit positiver Chemotaxis. Auf welche Stoffe sie jedoch genau reagieren, ist noch nicht bekannt und hängt möglicherweise auch von den verschiedenen Agrobakterien-Stämmen ab (Winans, 1992).

Der nächste Schritt der Infektion ist die Bindung des Agrobakteriums an eine Pflanzenzelle. Man nimmt an, dass dieser Schritt von Rezeptoren sowohl bakterieller als auch pflanzlicher Natur abhängt. Die Fähigkeit, an eine Pflanzenzelle zu binden, scheint ausschließlich im Genom der Agrobakterien codiert zu sein, da alle bekannten Mutationen auf dem Ti-Plasmid diese Fähigkeit nicht beeinträchtigen, sondern nur chromosomale Mutationen.

Im nächsten Schritt werden die auf dem Ti-Plasmid liegenden *vir*-Gene aktiviert. Dies kann ebenfalls durch von Pflanzenwunden ausgeschiedene phenolische Substanzen (z.B. Acetosyringon), Monomere der Zellwandpolysaccharide (z.B. Arabinose, Galactose) oder sogar durch Opine geschehen. Da *vir*-Gene für die Virulenz der Agrobakterien verantwortlich sind, und ihre Aktivierung durch im Pflanzenreich sehr weit verbreitete Zellbestandteile geschieht, kann man verstehen, warum Agrobakterien ein breites Wirtsspektrum aufweisen und nicht spezifisch nur eine Pflanzenart oder -gattung infizieren können, wie etwa Rhizobien.

Die Aktivierung der *vir*-Gene findet über ein Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem statt. Der erste Schritt ist dabei die Autophosphorylierung des membrangebundenen VirA-Sensor-Proteins durch die Interaktion mit den oben erwähnten Pflanzenstoffen. Das phosphorylierte VirA überträgt das Phosphat auf VirG. VirG ist ein Transkriptionsregulator, durch dessen Phosphorylierung die *vir*-Gen-Promotoren angeschaltet werden. Es existieren etwa 25 verschiedene *vir*-Gene, die in etwa 7-8 Operons zusammengefasst sind. Durch die Expression dieser Gene werden mehrere Prozesse in die Wege geleitet. Einer davon ist das Ausschneiden eines Einzelstranges der T-DNA durch die Proteine VirD1 und VirD2. Diese beiden Proteine interagieren miteinander und sind strang- und schnittstellenspezifische Endonucleasen. VirD2 bindet nach dem Herausschneiden des Einzelstranges an dessen 5'-Ende, und der Komplex wird vermutlich durch Helicasen freigegeben. Aus dem Einzelstrang im Ti-Plasmid wird durch Reparaturmechanismen wieder ein Doppelstrang hergestellt. Der mobile Einzelstrang wird von VirE2 umhüllt, um ihn vor Abbau zu schützen und den Transport in der Pflanzenzelle zu ermöglichen. Man vermutet, dass dies erst in der Pflanzenzelle geschieht und der T-DNA-Strang und VirE2 komplexiert mit VirE1 getrennt in die Pflanzenzelle gelangen und erst dort den sogenannten T-Komplex bilden.

Der T-DNA-Strang und die Proteine gelangen über ein Typ IV-Sekretions-System, bestehend aus einem Pilus und einem Transporterkomplex, in die Pflanzenzelle. Daran beteiligt sind die Proteine VirD4 (Transporter) und VirB1, VirB2 und VirB5 (Pilus). In der Pflanzenzelle sorgen die mit dem T-DNA-Strang assoziierten Proteine durch ihre nukleären Lokalisationssignale für den aktiven Transport in den Zellkern. Dabei interagieren sie mit diversen pflanzlichen Proteinen (z.B. RocA, Roc4 und CypA zur Proteinstabilisierung des T-Komplexes; AtKAP α zum Import in den Zellkern in *Arabidopsis thaliana*). Der letzte Schritt ist die Integration des T-DNA-Stranges in das Pflanzengenom. Es ist noch nicht bekannt, ob die T-DNA als

Doppelstrang oder als Einzelstrang in das Genom integriert wird, nur dass verschiedene pflanzliche Gene an dem Prozess beteiligt sein müssen, da die bakteriellen Proteine VirE2 und VirD2 nicht direkt für den Integrationsvorgang verantwortlich sind.

Die Expression der T-DNA in der Pflanze führt dann letztendlich zur Bildung von Tumoren und der Produktion und Sekretion von Opinen.

Die Gene der T-DNA stammen evolutionär nicht von Pflanzengenen ab, haben aber viele eukaryotische Strukturen, wie PolyA-Schwanz der mRNA, oder eukaryotische Regulierung der Expression. Im Gegensatz zu pflanzlichen Genen, enthalten sie jedoch keine Introns.

laaM und *iaaH* (auch *tms1* und *tms2*) sind Gene, die zu einer vermehrten Auxinbildung führen. In *A. tumefaciens* führt das *ipt*-Gen zur Bildung von Isopentenyl-AMP, welches in den Pflanzen zu den Cytokinin *trans*-Zeatin und *trans*-Ribosylzeatin umgewandelt wird. Weitere Gene tragen zur Tumorbildung bei.

Bei *A. rhizogenes* sind die vier sogenannten *rol*-Gene (= root oncogenic locus) für die Bildung der Hairy Roots verantwortlich. Diese Gene beeinflussen vermutlich ebenfalls den Hormonhaushalt. So soll *rolA* in den Gibberellin-Haushalt involviert sein. Zusätzlich wird durch die *rol*-Gene die Empfindlichkeit gegenüber exogenem Auxin erhöht. Manche Stämme übertragen zusätzlich Auxin-Biosynthese-Gene, jedoch nie *ipt*-Gene. Auxin-Biosynthese-Gene begünstigen die Bildung von Hairy Roots und erweitern das Wirtsspektrum. Es wird auch vermutet, dass nicht nur die *rol*-Gene für eine erfolgreiche Hairy Root Induktion verantwortlich sind, sondern noch andere ORFs der T-DNA essentiell sind.

Desweiteren werden Opin-Biosynthese-Gene exprimiert, die für die Bildung der entsprechenden Opine sorgen. Für die Exkretion der Opine ist das *ons*-Gen verantwortlich.

Nicht außer acht lassen darf man die Vorgänge, die durch eine Infektion mit Agrobakterien in den Pflanzen ausgelöst werden. Dabei spielen nicht nur Gene eine Rolle, die auch bei einer normalen Infektion induziert werden (hypersensitive Reaktion), sondern auch spezifisch durch Agrobakterien induzierte Gene. Darunter fällt z.B. ein Nodulin-ähnliches Protein, welches auch bei mit Rhizobien infizierten Pflanzen exprimiert wird und eine Rolle bei Zellteilung und -differenzierung spielt. Ein weiteres Protein ist eine Lectin-ähnliche Proteinkinase, die zur Zell-Zell-Erkennung mit Rhizobien beiträgt. Besonders zu erwähnen sind hier noch einmal die *rol*-Gene, die durch *A. rhizogenes* übertragen werden. Diese Gene sorgen bei aus Hairy Roots regenerierten Pflanzen zu ausgeprägten Phänotypen (hairy root syndrome), die einzelnen *rol*-Genen zugeordnet werden können (Schmülling et al., 1988). Gekräuselte Blätter werden durch *rolA* verursacht, kurze Internodien und der Verlust der Apikaldominanz von *rolC*, reduzierter Geotropismus der Wurzeln und eine veränderte Blütenmorphologie sind das Resultat von *rolB* und *rolC*. Wie diese Merkmale durch die *rol*-Gene zustande kommen, ist noch nicht bekannt, aber sie scheinen Entwicklungsvorgänge in

der Pflanze stark zu beeinflussen. Es kann sich jedoch bei der Untersuchung von Hairy Roots auf ihre Sekundärmetabolite ein Problem ergeben. Es ist bekannt, dass *rol*-Gene sich teils aktivierend, teils inhibitorisch auf manche Stoffwechselwege auswirken (Bulgakov et al., 2005). Dies alles sollte man sich bewusst machen, wenn man mit dem Transformati-
ons-system *A. rhizogenes* arbeitet, und man sollte bedenken, welche Effekte es eventuell auf die geplanten Untersuchungen haben könnte. Trotz seiner Natürlichkeit ist die Agrobakterien-induzierte Transformation ein künstliches, von noch nicht genau bekannten Vorgängen geprägtes System (zusammengefasst von Tzfira und Citovsky, 2002; Winans, 1992; Veena und Taylor, 2007).

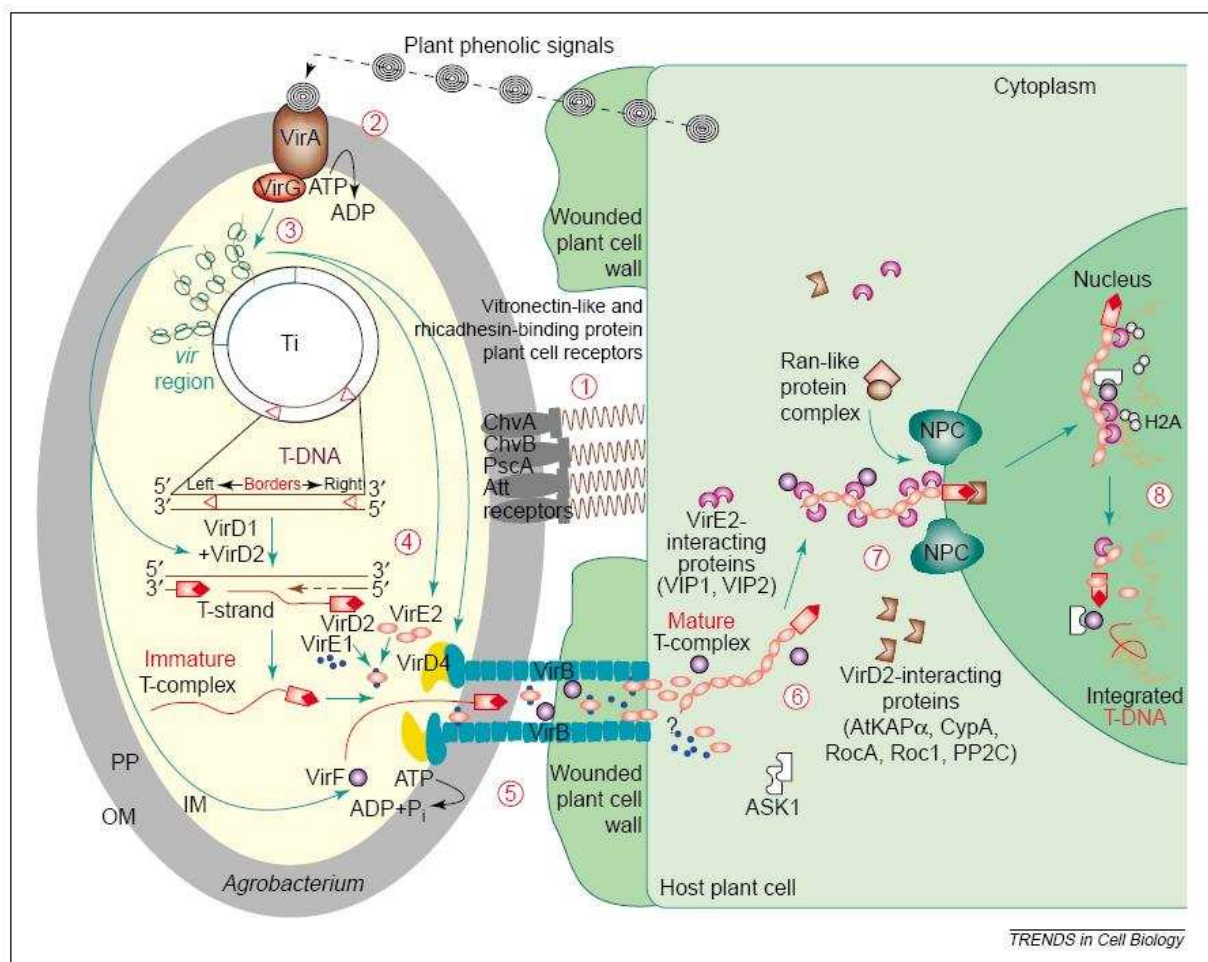


Abb. 1.5.: Schematischer Ablauf der Transformation einer Pflanzenzelle durch Agrobakterien; (1) Erkennung und Bindung an die Pflanzenzelle; (2) Zwei-Komponenten-Signaltransduktion zur Aktivierung der *vir*-Gene; (3) Expression der *vir*-Gene; (4) Erstellung der mobilen T-DNA (T-Strang); (5) Zusammenstellung des VirB-VirD4-Transport-Komplexes, Transport des T-Strangs und der Vir-Proteine in die Pflanzenzelle; (6) Bildung des T-Komplexes; (7) Transport des T-Komplexes in den Zellkern mit Hilfe pflanzlicher Proteine; (8) T-DNA-Integration in das pflanzliche Genom (Abbildung nach Tzfira und Citovsky, 2002).

1.3.5. Anwendungen der Hairy Roots

Untersuchungen von 1980 zeigten, dass Hairy Roots ohne die externe Gabe von Hormonen im Medium kultiviert werden können (Veena und Taylor, 2007). Die stabile Transformation, ihr schnelles Wachstum, eine einfache Handhabung und die Fähigkeit, verschiedenste chemische Verbindungen und Proteine zu synthetisieren, machen sie zu einem geeigneten Werkzeug in der Wissenschaft (Veena und Taylor, 2007). Hairy Roots werden gerne zu Studien des Sekundärmetabolismus, für Genfunktionsanalysen, zu Promotoranalysen mit Promotor/Reportergen-Konstrukten, zur Untersuchung von Expressionsmustern und zum „metabolic engineering“ verwendet. So können gewisse pflanzliche Inhaltsstoffe aus dem Bioreaktor mit Hairy Roots gewonnen werden, um so gefährdete Pflanzen zu schützen.

Eine neuere Anwendung der Hairy Roots für Untersuchung, die die ganze Pflanze betreffen, sind die „composite plants“. Hier werden an einem Wildtyp-Spross transgene Wurzeln mit *A. rhizogenes* induziert (Veena und Taylor, 2007).

Das Problem bei der Regeneration von Pflanzen aus mit *A. rhizogenes* transformiertem Pflanzenmaterial ist der Hairy Root-Phänotyp, verursacht durch die *rol*-Gene. Veena et al. (2007) versuchten, dieses Problem durch einen entschärften *A. rhizogenes*-Stamm, aus dem die *rol*-Gene entfernt wurden, zu umgehen. Von Interesse ist dies, da *A. rhizogenes* in der Lage ist ein größeres Spektrum an Pflanzen zu transformieren. Vor allem Nutzpflanzen wie Soja und Alfalfa, welche sich nicht durch *A. tumefaciens* transformieren lassen, könnten damit transformiert werden. Die Transformation durch Agrobakterien ist zuverlässiger und stabiler als das Einbringen von Genen durch Partikelbeschuss.

1.4. Rosmarinsäurebiosynthese

1.4.1. Rosmarinsäure und ihr Vorkommen

Die Rosmarinsäure ist ein Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure. Rosmarinsäure wird zusammen mit anderen Phenolcarbonsäureestern unter dem Begriff Labiatengerbstoffe zusammengefasst, da sie gerbende Eigenschaften aufweisen und früher vor allem bei den Lamiaceae bekannt waren. Seit ihrer Entdeckung 1958 von Scarpati und Oriente in Rosmarin konnte Rosmarinsäure jedoch auch in vielen anderen Pflanzenfamilien nachgewiesen werden, z.B. in Boraginaceae (Kelley et al., 1975), Marantaceae (Abdullah et al., 2008), Cucurbitaceae (De Tommasi et al., 1991), Apiaceae (Olivier et al., 2008) und sogar in einigen Farnen (Harborne, 1966) und Hornmoosen (Takeda et al., 1990). Es ist bis jetzt jedoch nicht bekannt, ob die Synthese der Rosmarinsäure ein in der Evolution früh entstandener Reaktionsweg ist, oder ob er unabhängig in mehreren Familien entstanden ist (Petersen und Simmonds, 2003). Aufgrund der Anreicherung von Rosmarinsäure in

Pflanzenzellkulturen bei Zugabe von Elicitoren wie Hefeextrakt oder Methyljasmonat wird vermutet, dass Rosmarinsäure in den Pflanzen als Abwehrstoff gegen Pathogene und Herbivoren dient. Einen zusätzlichen Hinweis auf diese Rolle liefern Versuche mit Tabakschwärmer-Larven. Rosmarinsäure ist für die Tiere zwar nicht toxisch, aber hält sie davon ab, diese Pflanzen als Nahrung zu sich zu nehmen (Petersen und Simmonds, 2003). Rosmarinsäure weist unterschiedliche biologische Aktivitäten auf, darunter adstringierende, antioxidative, antiinflammatorische, antimutagene, antibakterielle und antivirale Wirkungen. Aufgrund dieser Eigenschaften werden Pflanzenextrakte, die Rosmarinsäure enthalten, gegen *Herpes simplex*-Infektionen eingesetzt und in einigen Kosmetika verwendet (zusammengefasst in Petersen und Simmonds, 2003).

1.4.2. Biosynthese der Rosmarinsäure

Ellis und Towers konnten 1970 zeigen, dass Rosmarinsäure aus den beiden Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin synthetisiert wird, als sie *Mentha spec.* radioaktive Aminosäuren anboten, dabei stammt die Kaffesäure-Einheit von L-Phenylalanin ab und die 3,4-Dihydroxymilchsäure von L-Tyrosin (Ellis und Towers, 1970). 1993 wurde von Petersen et al. ein möglicher Biosynthese-Weg in *Coleus blumei* für die Rosmarinsäure vorgeschlagen, da zu diesem Zeitpunkt alle beteiligten Enzyme isoliert und *in vitro* nachgewiesen werden konnten (Abb. 1.6.). Ausgehend von L-Phenylalanin katalysiert die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL, E.C. 4.3.1.5.), deren Aktivität mit der Rosmarinsäureakkumulation korreliert, die Desaminierung von L-Phenylalanin zu *t*-Zimtsäure (Razzaque und Ellis, 1977). Daraufhin findet eine Hydroxylierung der *t*-Zimtsäure an Position 4 statt, die von der Cytochrom P450 Monooxygenase Zimtsäure 4-Hydroxylase (CAH, E.C. 1.14.13.11) katalysiert wird (Petersen, 1997). Die dabei entstandene 4-Cumarsäure (pC) wird durch die Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase (4CL, E.C. 6.2.1.12) zu 4-Cumaroyl-CoA (pC-CoA) umgesetzt, dies dient der Aktivierung für die anschließende Veresterung. 4-Cumaroyl-CoA ist nicht nur eine Zwischenstufe der Rosmarinsäurebiosynthese, es kann auch in den Ligninstoffwechsel eingebracht werden und trägt zur Bildung von phenolischen Pigmenten wie Flavonoiden bei. Die bisher erwähnten Enzyme (PAL, CAH, 4CL) sind daher auch als allgemeiner Phenylpropanstoffwechsel bekannt.

L-Tyrosin als zweite Ausgangssubstanz wird in einer Transaminierungsreaktion zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) umgesetzt. Dabei überträgt die Tyrosin Aminotransferase (TAT, E.C. 2.6.1.5) die Aminogruppe auf 2-Oxoglutarat. 4-Hydroxyphenylpyruvat dient auch als Ausgangsstoff für die Synthese von Tocopherolen und Plastochinonen. 4-Hydroxyphenylpyruvat wird in einer weiteren Reaktion durch das Enzym Hydroxyphenyl-

pyruvat Reduktase (HPPR, E.C. 1.1.1.237) zu 4-Hydroxyphenyllaktat (pHPL) umgesetzt. Dieses Laktat wird nun mit der durch Coenzym A aktivierten 4-Cumarsäure verestert.

Die Veresterung von 4-Hydroxyphenyllaktat mit 4-Cumaroyl-CoA übernimmt das Enzym Rosmarinsäure Synthase (RAS, E.C. 2.3.1.140), und es entsteht 4-Cumaroyl-4'-hydroxyphenyllaktat. Die Bezeichnung RAS ist eigentlich nicht korrekt, und dieses Enzym sollte als Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllaktat Hydroxycinnamoyltransferase bezeichnet werden. Es ist somit den Hydroxycinnamoyltransferasen zuzuordnen. Anschließend finden zwei Hydroxylierungsreaktionen statt, die durch Cytochrom P450 Enzyme katalysiert werden, die Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3-Hydroxylase und 3'-Hydroxylase. Beide Reaktionen sind sehr substratspezifisch, da nur 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllaktat (pC-pHPL) oder die teilhydroxylierten Zwischenstufen Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllaktat (Caff-pHPL) oder 4-Cumaroyl-3',4'-Dihydroxyphenyllaktat (pC-DHPL) akzeptiert werden (Petersen et al., 1993).

Da sie von besonderem Interesse für diese Arbeit sind, sollen die Rosmarinsäure-biosynthese-Enzyme HPPR und RAS in den folgenden Abschnitten noch einmal näher betrachtet werden.

1.4.3. HPPR

Die HPPR, die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase, katalysiert die Reduktion von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu 4-Hydroxyphenyllaktat. Die Enzyme PAL, CAH und 4CL sind, wie bereits oben erwähnt, auch aus dem Phenylpropanstoffwechsel bekannt und die TAT trägt auch zur Bildung der Plastochinone und Tocopherole bei. Daher ist möglicherweise die HPPR, zusammen mit der RAS und den beiden Cytochrom P450 Hydroxylasen, ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäure-Biosynthese. Da die HPPR-Aktivität mit der Rosmarinsäure-Akkumulation korreliert, deutet dies ebenfalls auf das Vorkommen eines spezifischen Enzyms hin (Gertlowski und Petersen, 1993). Häusler et al. (1991) charakterisierten die HPPR aus Zellkulturen von *Coleus blumei* und fanden heraus, dass dieses Enzym neben 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) auch 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP) akzeptiert. Das natürliche Substrat ist vermutlich jedoch pHPP, da DHPP *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte und der K_m -Wert für DHPP höher ist als für pHPP.

Kim et al. (2004) klonierten und exprimierten eine HPPR aus einer cDNA-Bank auf der Grundlage von Teilproteinsequenzen aufgereinigter HPPR aus *Coleus blumei* (Kim et al., 2004). Die cDNA ist 942 bp lang und codiert für ein Protein von 313 Aminosäuren.

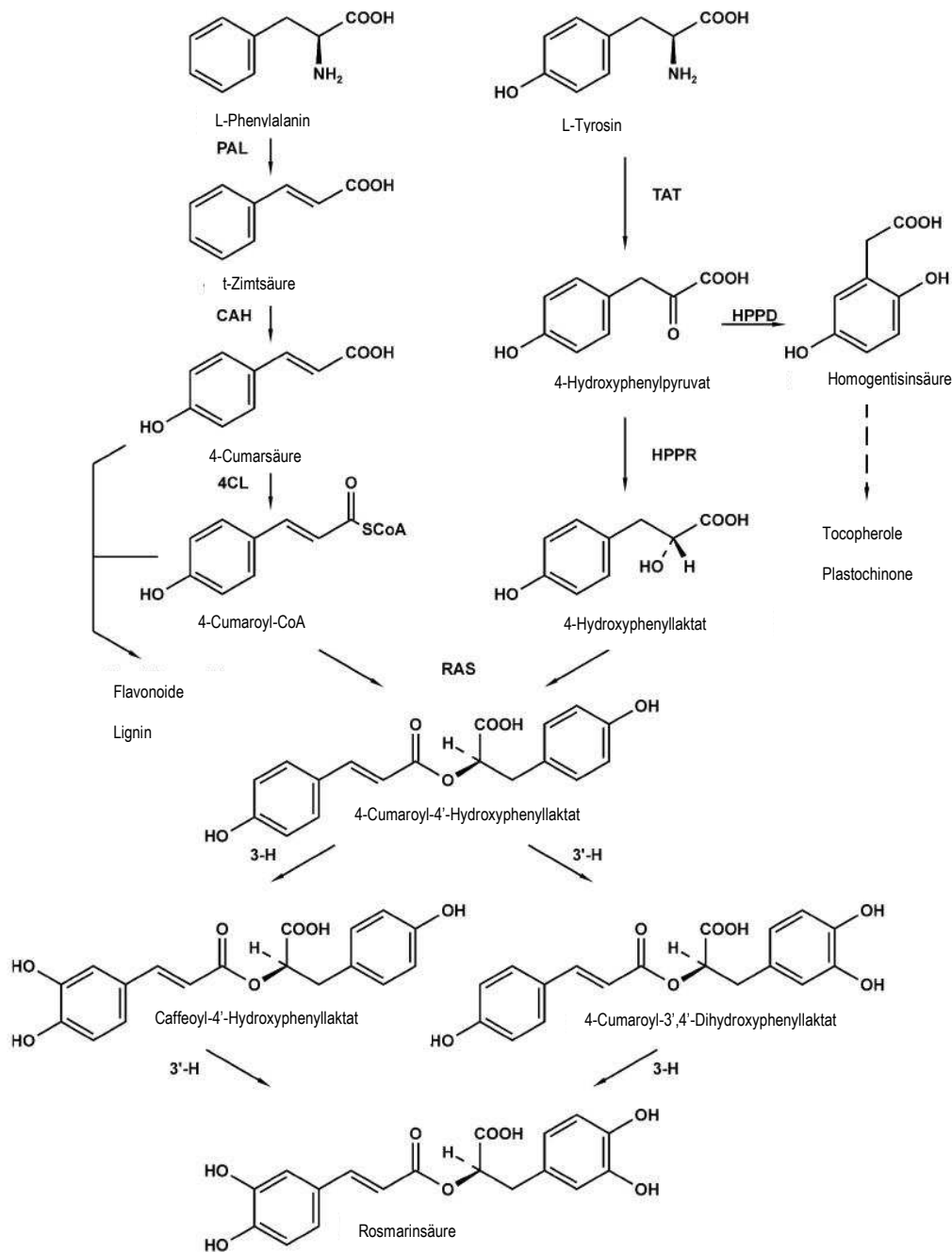


Abb. 1.6.: Schema der Rosmarinsäurebiosynthese nach Petersen und Simmonds (2003): PAL (Phenylalanin Ammoniak-Lyase); CAH (Zimtsäure 4-Hydroxylase); 4CL (Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase); TAT (Tyrosin Aminotransferase); HPPR (4-Hydroxyphenylpyruvat Reduktase); RAS (Rosmarinsäure Synthase); 3'-H (Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3'-Hydroxylase); 3-H (Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3-Hydroxylase)

Das heterolog exprimierte Enzym wurde funktionell charakterisiert, und Janiak konnte das Protein kristallisieren und seine Struktur aufklären (Kim et al., 2004; Janiak, 2007). Als Cosubstrate kommen NADPH und NADH in Frage, wobei NADH geringere Affinität aufweist. Von dem heterolog exprimierten Enzym wurden die erwarteten Substrate pHPP und DHPP umgesetzt, doch es akzeptierte auch Substrate wie Hydroxypyruvat, Pyruvat, Glyoxylat und Phenylpyruvat, mit der höchsten Affinität für Hydroxypyruvat (Janiak, 2007). Hydroxypyruvat ist ein Zwischenprodukt der Photorespiration und wird von Hydroxypyruvat Reduktasen (HPRs) zu Glycerat umgesetzt. Von den HPRs existieren eine cytosolische NADPH-abhängige (HPR2: E.C. 1.1.1.81) und eine peroxisomale NADH-abhängige Form (HPR1: E.C. 1.1.1.29) (siehe Kapitel 1.5.). Die Aminosäuresequenz der HPPR aus *Coleus blumei* besitzt 87% Ähnlichkeit mit der cytosolischen HPR2 aus *Arabidopsis thaliana* (tair: AT1G79870.1). *Arabidopsis thaliana* ist jedoch nicht bekannt für Rosmarinsäureakkumulation. Deshalb stellt sich die Frage, ob die von Kim et al. klonierte HPPR sowohl am Primärstoffwechsel beteiligt ist als auch am Sekundärstoffwechsel der Rosmarinsäurebiosynthese. Aus diesem Grund, wurden die RNAi-Experimente dieser Arbeit durchgeführt. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit Datenbanken stellte sich heraus, dass die von Kim et al. (2004) klonierte HPPR eine D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase ist (Abb. 1.7.). Diese Proteinklasse ist vor allem aus bei Prokaryoten bekannt und wurde 1989 von Grant als eigene Enzymfamilie definiert. Enzyme dieser Familie akzeptieren nur D-Isomere, die eine Hydroxygruppe am C₂-Atom mit benachbarter Säurefunktion aufweisen. Diese Hydroxygruppe wird zu einer Oxogruppe oxidiert, während NAD⁺/NADP⁺ reduziert wird. Die Rückreaktion wird ebenfalls katalysiert. Das Enzym besitzt zwei Domänen, eine Substrat-Bindedomäne (oder katalytische Domäne) und eine Cosubstrat-Bindedomäne. Zwischen beiden Domänen liegt das aktive Zentrum (oder die katalytische Spalte). Die Enzyme dieser D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase-Familie weisen etwa 17 bis 19 hoch konservierte Aminosäuren auf (Grant, 1989; Kochhar et al., 1992), die vor allem in der Cosubstrat-Bindedomäne liegen und das Motiv GxGxxG tragen. Weitere konservierte Aminosäuren befinden sich in der Substrat-Bindedomäne, sie sind aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifitäten variabler als für das Cosubstrat. Die D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen liegen meist als Dimere, seltener als Tetramere vor (Kochhar et al., 1992). Auch die Struktur der HPPR, die von Janiak (2007) aufgeklärt wurde, entspricht diesem allgemeinen Aufbau und weist das aktive Enzym als Dimer aus (siehe Abb. 1.8.). Der genaue Reaktionsmechanismus ist nicht bekannt, da Kristallisationen der HPPR mit Substrat nicht erfolgreich waren (Janiak, 2007).

```

1 ATGGAGGCGATTGGCGTTTTGATGATGTGCCCGATGAGCACCTACTTGGAGCAAGAGCTT
1 M E A I G V L M M C P M S T Y L E Q E L

61 GACAAGCGGTTCAAGCTCTTTTCGTTACTGGACTCAGCCGGCGCAGCGCGACTTCCTCGCT
21 D K R F K L F R Y W T Q P A Q R D F L A

121 CTGCAGGCCGAGTCTATCCGCGCGGTGGTTGGGAATTCGAACGCCGGTGCCGATGCTGAG
41 L Q A E S I R A V V G N S N A G A D A E

181 TTGATCGACGCACTGCCGAACTGGAGATTGTGTCGAGCTTTAGCGTGGGTCTGGATAAG
61 L I D A L P K L E I V S S F S V G L D K

241 GTTGACTTGATCAAGTGTGAGGAGAAGGGGGTTAGGGTTACCAACAGCCCCGATGTGCTG
81 V D L I K C E E K G V R V T N T P D V L

301 ACGGATGACGTCGCGGATTTGGCGATCGGGTTGATTTTGGCGGTTTTGAGCGGATTGTG
101 T D D V A D L A I G L I L A V L R R I C

361 GAGTGTGATAAGTATGTGAGGAGAGGGGCGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGACGACT
121 E C D K Y V R R G A W K F G D F K L T T

421 AAGTTCAGCGGTAAAAGAGTTGGCATCATAGGATTGGGCAGAATCGGGTTAGCAGTTGCT
141 K F S G K R V G I I B L B R I B L A V A

481 GAGCGAGCAGAGGCATTTGATTGTCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCAAC
161 E R A E A F D C P I S Y F S R S K K P N

541 ACAAACTACACATACTATGGCAGCGTTGTAGAATTGGCGTCAAACAGTGACATCCTAGTC
181 T N Y T Y Y G S V V E L A S N S D I L V

601 GTAGCATGTCCCCTGACTCCAGAAACAACATCATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCT
201 V A C P L T P E T T H I I N R E V I D A

661 CTGGGTCCAAAGGAGTTCTCATCAACATTGGAAGGGGACCTCATGTTGATGAGCCCCGAA
221 L G P K G V L I N I G R G P H V D E P E

721 CTGGTGTCTGCTCTTGTGGAGGGCCGTCTGGGTGGCGCTGGTCTTGATGTATTCGAAAGG
241 L V S A L V E G R L G G A G L D V F E R

781 GAACCAAGAGGTACCGGAGAAGCTCTTCGGTCTGGAAAATGTTGTCCTGTTGCCACATGTA
261 E P E V P E K L F G L E N V V L L P H V

841 GGGAGTGGCACCGTGGAAACGCGTAAAGTGATGGCTGATCTTGTCTCGTGGAAACTTGGAA
281 G S G T V E T R K V M A D L V V G N L E

901 GCTCACTTCTCCGGCAAGCCTCTCTTAAGTCCAGTAGTTTGA
301 A H F S G K P L L T P V V *

```

Abb. 1.7.: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der HPPR von Kim et al. (2004). Die in D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen konservierten Aminosäuren sind farbig markiert: das GxGxxG-Motiv der Cosubstrat-Bindedomäne in blau, weitere konservierte Aminosäuren in rot.

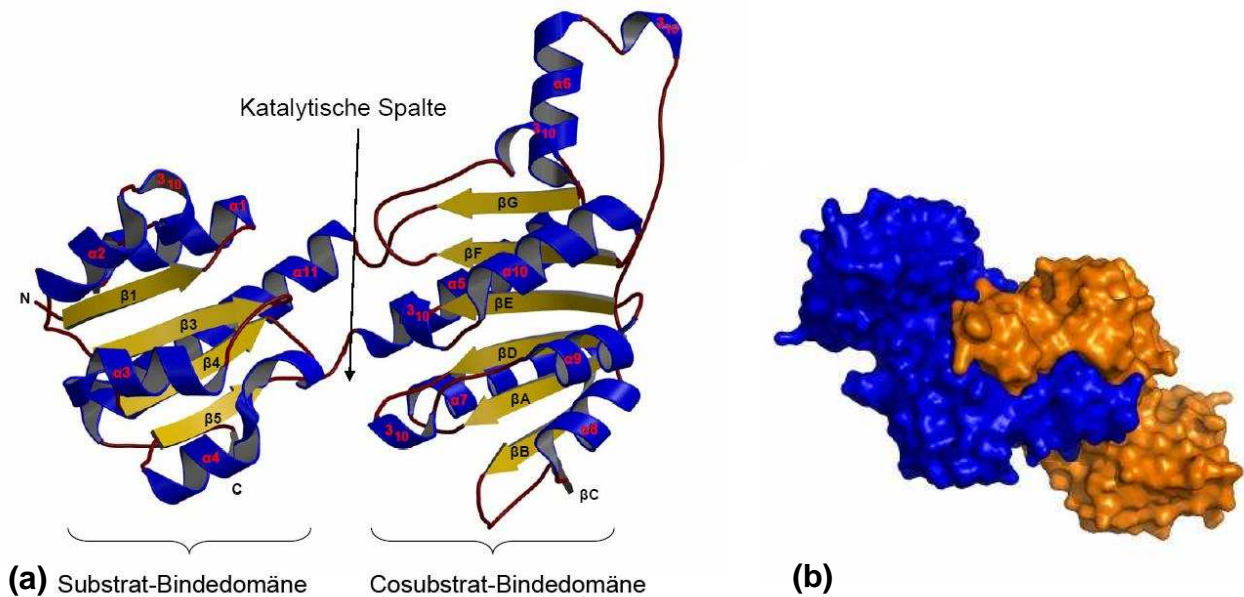


Abb. 1.8.: Struktur der HPPR nach Janiak (2007); **(a)** Monomer-Struktur; **(b)** Dimer-Struktur

1.4.4. RAS

Ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese ist die RAS, die die Veresterung der beiden intermediären Vorstufen aus den Ausgangsaminosäuren katalysiert. In nativer Form setzt sie vorzugsweise die monohydroxylierten Substrate 4-Cumaroyl-CoA und pHPL um, akzeptiert jedoch auch die dihydroxylierten Formen Caffeoyl-CoA und DHPL (Petersen, 1991). Als ungeeignete Substrate für die rekombinant exprimierte RAS erwiesen sich Shikimisäure und Chinasäure (Berger et al., 2006). Damit unterscheidet sich die RAS trotz Sequenzähnlichkeit von etwa 55% mit einer Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure/Chinasäure Hydroxycinnamoyltransferase aus *Nicotiana tabacum* (Hoffmann et al., 2003) von anderen Hydroxycinnamoyltransferasen. Hydroxycinnamoyltransferasen sind zusammen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen an der Biosynthese von phenolischen Verbindungen und Lignin-Monomeren beteiligt durch die Bildung von Caffeoyl-CoA aus 4-Cumaroyl-CoA über die Zwischenstufen eines Esters mit Shikimisäure und/oder Chinasäure (HCT/HQT) (Hoffmann et al., 2004). Eine andere Rolle der Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinasäure Hydroxycinnamoyltransferasen (HQTs), die (fast) nur Chinasäure akzeptieren, ist die Bildung von Chlorogensäure, welche in vielen Pflanzen der Pathogenabwehr dient und antioxidative Eigenschaften besitzt. Dies zeigt, dass die RAS ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese ist und wahrscheinlich nicht einem grundlegenden Stoffwechselweg wie der Ligninsynthese angehört (Petersen et al., 2009).

Eine RAS-cDNA aus *Coleus blumei* erhielt man auf Grundlage von Peptidsequenzen aus aufgereinigtem RAS-Protein aus Zellkulturen (Berger et al., 2006). Das offene Leseraster der RAS umfasst 1290 bp und kodiert für ein Protein mit 430 Aminosäuren (Abb. 1.9.), das durch Sequenzvergleich mit Datenbanken der Proteinsuperfamilie der BAHD Acyltransferasen zugeordnet werden konnte (Berger et al., 2006).

BAHD Acyltransferasen katalysieren im Allgemeinen den Acyltransfer einer mit Coenzym A-aktivierten Säure auf verschiedene Akzeptormoleküle und sind vor allem am Sekundärmetabolismus beteiligt (z.B. Vinorin Synthase aus *Rauvolfia serpentina*, Ma et al., 2005; Anthocyan 5-aromatische Acyltransferase aus *Gentiana triflora*, Fujiwara et al., 1998).

Die Familie der BAHD Acyltransferasen wurde nach den ersten vier bekannten Enzymen dieser Familie benannt (D'Auria, 2006). Diese Enzyme sind typischerweise Monomere und enthalten die konservierten Motive HxxxD(G) und DFGWG. HxxxD(G) ist an der Substratbindung und Katalyse beteiligt und bedingt damit die Spezifität für CoA-aktivierte Säuren. Das DFGWG-Motiv liegt in der Nähe des C-Terminus (Abb. 1.9.). Seine Funktion ist noch nicht näher bekannt, scheint aber nicht direkt am katalytischen Mechanismus beteiligt zu sein. Mutationsstudien zeigen jedoch, dass Veränderungen in beiden Motiven zu einer starken Verminderung der Enzymaktivität führen (zusammengefasst von D'Auria, 2006).

Die Struktur und der Reaktionsmechanismus der Vinorin Synthase wurden von Ma et al. (2005) aufgeklärt. Da der Histidin-Rest im HxxxD(G) in allen Acyltransferasen konserviert ist, wird angenommen, dass die Reaktionen ähnlich verlaufen. Die Vinorin Synthase ist ein globuläres Protein mit zwei Domänen, die über eine Schleife verbunden sind (Abb. 1.10.). Der Kanal zwischen den beiden Domänen bildet das aktive Zentrum, in das der Histidin-Rest hineinragt. Das Histidin deprotoniert den Stickstoff oder Sauerstoff des Akzeptormoleküls. Durch einen nukleophilen Angriff auf den Carbonylrest des CoA-Esters entsteht eine tetraedrische Zwischenstufe, welche durch Protonierung CoA und den acylierten Ester bzw. das acylierte Amid freisetzt (Ma et al., 2005).

Die RAS aus *Coleus blumei* enthält auf genomischer Ebene ein Intron von 914 bp Länge, das nach 405 bp zu finden ist (Petersen et al., 2009). Dies ist ein sogenanntes Q-Intron, da es typischerweise nach der Aminosäure Glutamin (im Einbuchstabencode Q) zu finden ist, und zwar 17 Aminosäuren vor dem HxxxD(G)-Motiv.

Die meisten Enzyme dieser Superfamilie scheinen im Cytosol lokalisiert zu sein, und auch die RAS von Berger et al. (2006) besitzt keine bekannten Signalsequenzen für Zellkompartimente.

```

1 ATGAAGATAGAAGTCAAAGACTCGACTATGATAAAGCCGTCGGCGGAGACGCCGGGGGGG
1 M K I E V K D S T M I K P S A E T P G G

61 AGTTTGTGGCTCTCAAATTTGGACTTGTTCGCGGCCAACTACCACACCCTCAGCGTG
21 S L W L S N L D L L S P A N Y H T L S V

121 CACTTCTACAGCCACGACGGCTCCGACAACTTCTTCGACGCGGCGGGGTTGAAGGAGTCG
41 H F Y S H D G S D N F F D A A G L K E S

181 CTCAGCCGAGCTCTGGTTGAGTTCTACCCTTACGCGGGGAGGTTGAAGCTGAACGGCAAC
61 L S R A L V E F Y P Y A G R L K L N G N

241 CGCCTCGAGATCGACTGTAACAACGAGGGGTTGCTGTTGGTGGAGGCGGAGTGCAGCGGC
81 R L E I D C N N E G L L L V E A E C D G

301 CGGTTGGATGAGCTCGGCGACTTCGCCCCCGCCGAGCTCAACCTCATCCCTAAAGTG
101 A L D E L G D F A P R P E L N L I P K V

361 GATTATTCTCGAGGAATTTCCACATACCCTCTCATGGTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAA
121 D Y S R G I S T Y P L M V F Q L T R F K

421 TCGCGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAACGAGCACCCTTATCCGACGGCGTCGCGGCC
141 C G G V A L G V A N E H H L S D G V A A

481 CTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCAGCCGCGGCGCCCCCGCCCTACCCCGCTG
161 L H F I N T W A H L S R G A P A P T P L

541 CCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTCGCAACCCACCGCAGCGCAGTTCAGCCAC
181 P H F D R S S L S A R N P P Q P Q F S H

601 GCCGAGTACCAGCCTCCTCCCACTCTCGAAAACCTCTTCCCCACACCGACATCGCCAC
201 A E Y Q P P P T L E N P L P H T D I A H

661 TCCCGGTTCAAGCTCACCCGCGACCAGCTCAACTCCCTCAAGTCAAATTCAAAACGCC
221 S R F K L T R D Q L N S L K S K F K T A

721 CCCGCCGACGGCGGCGCCGCAAATCCTACAGCACGTTTCGAGGTTCTTGCGGCCATATC
241 P A D G G A G K S Y S T F E V L A G H I

781 TGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGCCTGCGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTCCACATC
261 W R S V C I A R G L P E G Q E T K L H I

841 CCCTTCGACGGCGCGGCGAGGCTGCAGCTGCGCGCGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTC
281 P F D G R G R L Q L P P G F F G N A I F

901 TTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGCGAGATCGAGTCAACTCGTGAATTACGCCGTG
301 F A T P I A T C G E I E S N S L N Y A V

961 CGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGCTGGATGAGGACTACCTGCGATCGTCGATCGAT
321 R R V S D G V S R L D E D Y L R S S I D

1021 TTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTGGCGCAGGGAGCTCACAGTTTCAGGTGC
341 F L E L Q E D I S K L A Q G A H S F R C

1081 CCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTGCCGATTTACGAGCCGGATTTCGGGTGG
361 P N L W V I S W V W L P I Y E P D F G W

1141 GGAAGGCGGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCGCGTTTGAAGGGAAGAGCTACCTTCTG
381 G K A V Y M G P W A A P F E G K S Y L L

1201 CCTAAGCGGAAAAAGATGGCAGCTTGTTCGTCTCCATCACTCTGCATAAGCAACACATG
401 P N P E K D G S L F V S I T L H K Q H M

1261 GAGAGATTGAGAAGTTGTTTTATGAGATTGA
421 E R F E K L F Y E I *

```

Abb. 1.9.: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der RAS aus *Coleus blumei* (Berger et al., 2006). Die in BAHD Acyltransferasen konservierten Aminosäuren sind farbig markiert: das DFGWG-Motiv in rot, das HxxxD(G)-Motiv in blau.

Um konkretere Aussagen über die Funktion der von Berger et al. klonierten RAS machen zu können und eventuell auch etwas über die Regulation der Rosmarinsäurebiosynthese herauszufinden, wurden RNAi- und Überexpressionsstudien im Zuge dieser Arbeit durchgeführt.

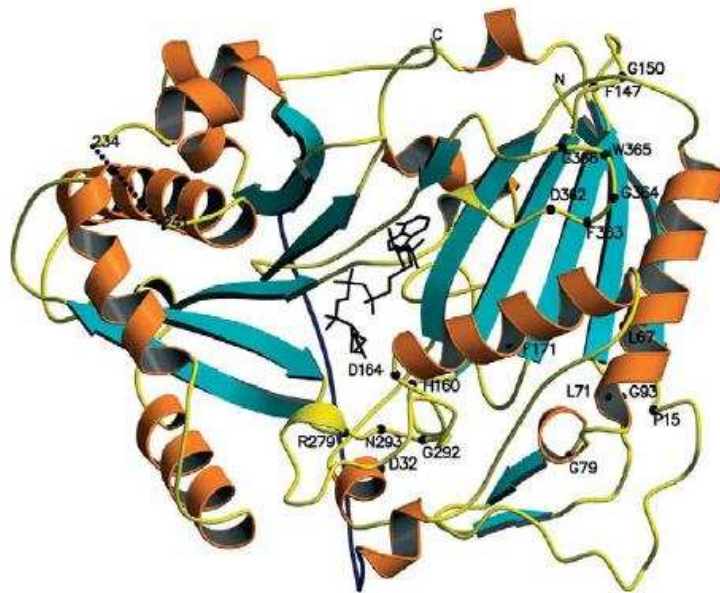


Abb. 1.10.: Struktur der Vinorin Synthase aus *Rauvolfia serpentina*. (aus Ma et al., 2005). In der Mitte der Darstellung ist in schwarz die Orientierung des Coenzym A gezeigt. Die Aminosäuren der konservierten Motive sind schwarz markiert: HxxxD(G) (mittig) und DFGWG (oben rechts).

1.5. HPR und Photorespiration

Die von Kim et al. (2004) klonierte HPPR aus *Coleus blumei* besitzt 87% Identität zu der von Timm et al. (2008) beschriebenen cytosolischen Hydroxypyruvat Reduktase (HPR2: E.C. 1.1.1.81) aus *Arabidopsis thaliana*. Aus diesem Grund sollte die rekombinante HPR2 aus *Arabidopsis thaliana* in dieser Arbeit charakterisiert werden.

Die HPR2 ist ein Enzym, das an der Photorespiration beteiligt ist. Die Photorespiration ist ein wichtiger Prozess des Primärstoffwechsels, der eine Nebenreaktion des Photosyntheseenzym Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO, E.C. 4.1.1.39) korrigiert. Die RubisCO ist für die Kohlendioxidfixierung verantwortlich und katalysiert die Carboxylierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat zu zwei 3-Phosphoglycerat. Über den Calvinzyklus werden Zucker synthetisiert und ausgeschleust und Ribulose-1,5-Bisphosphat regeneriert. Die dafür nötige Energie in Form von ATP und die Reduktionsäquivalente (NADPH) liefern die photosynthetischen Lichtreaktionen. Wie der Name der RubisCO bereits besagt, überträgt die RubisCO nicht nur Kohlendioxid, sondern auch Sauerstoff, besonders unter CO₂-armen Bedingungen, wie sie z. B. bei geschlossenen

Stomata auftreten. Dabei entsteht nur ein Molekül 3-Phosphoglycerat und außerdem ein Molekül 2-Phosphoglykolat. 2-Phosphoglykolat ist für die Pflanze in großen Mengen toxisch und wird deshalb über die Photorespiration entfernt und als 3-Phosphoglycerat wieder dem Calvinzyklus zugeführt (siehe Abb. 1.11.). Dies findet in mehreren Schritten statt, und es sind außer den Chloroplasten als Ort der Kohlenstoff/Sauerstoff-Fixierung noch Peroxisomen und Mitochondrien als Reaktionsorte beteiligt. Das durch Sauerstoff-Fixierung der RubisCO entstandene 2-Phosphoglykolat wird dephosphoryliert und als Glykolat in die Peroxisomen transportiert **(a)**. In den Peroxisomen wird das Glykolat zu Glyoxylat oxidiert. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das durch die Katalase in den Peroxisomen sofort zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt wird. Das Glyoxylat wird durch eine Transaminierung zu Glycin umgewandelt **(b)**. Glycin wird in die Mitochondrien transportiert, wo aus zwei Molekülen Glycin Serin gebildet und Kohlendioxid freigesetzt wird **(c)**. Serin wird wieder zurück in die Peroxisomen transportiert, und dort entsteht durch eine weitere Transaminierung Hydroxypyruvat. Hydroxypyruvat wird dann durch die peroxisomale HPR1 zu Glycerat umgesetzt und zurück in die Chloroplasten transportiert **(d)**. Dort findet eine Phosphorylierung statt und das so entstandene 3-Phosphoglycerat kann wieder in den Calvin-Zyklus eintreten **(e)** (Raven, 2000).

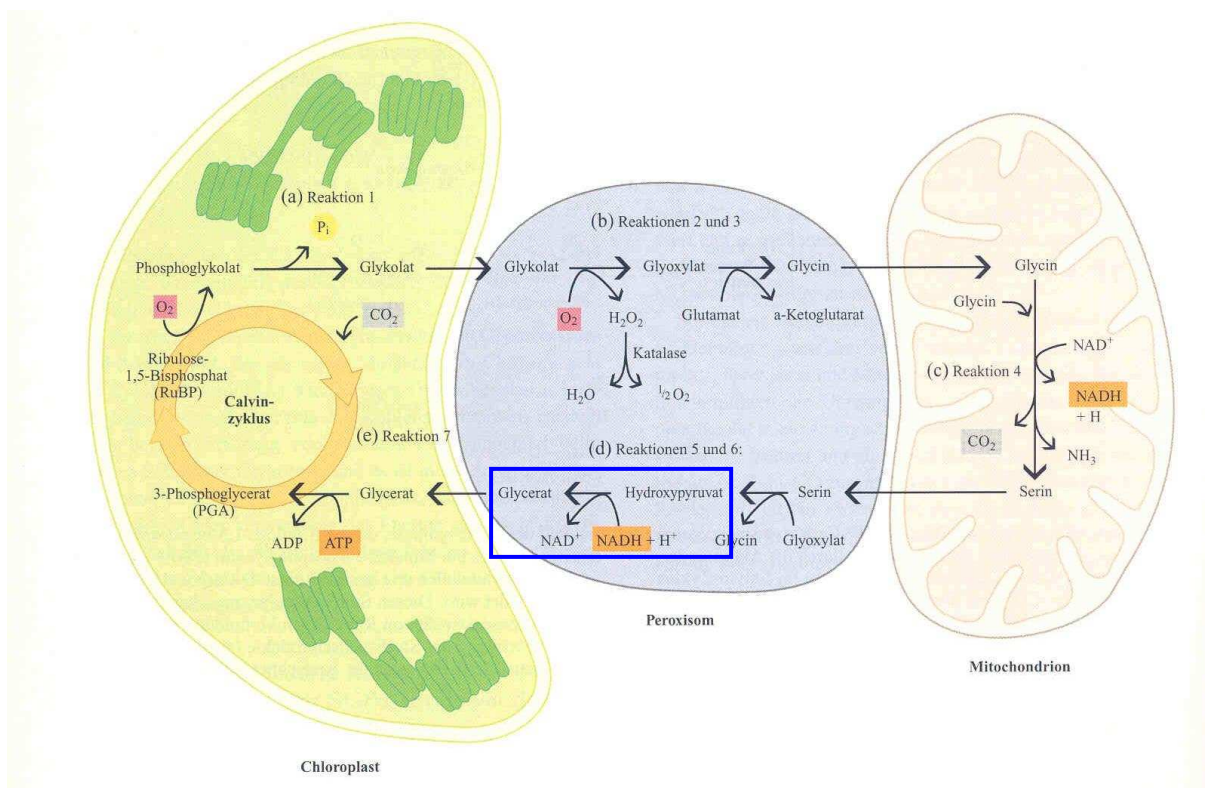


Abb. 1.11.: Schema der Photorespiration: zur Beschreibung der einzelnen Reaktionen (a) bis (e) siehe Text. Die Reaktion der peroxisomalen HPR1 ist durch einen blauen Kasten hervorgehoben. (Raven, 2000).

Viele Untersuchungen wurden bereits zur Photorespiration und den beteiligten Enzymen gemacht, doch gibt es noch immer große Lücken im Verständnis über deren Ablauf. Einige Studien ließen z.B. vermuten, dass die Reaktion von Hydroxypyruvat zu Glycerat spezifisch nur von der HPR1 durchgeführt wird (Heupel et al., 1991). Versuche mit einer Gersten-Mutante, die eine stark reduzierte HPR1-Aktivität aufwies, zeigten jedoch, dass unter Versuchsbedingungen keine Beeinträchtigung der Vitalität auftrat wie bei anderen Photorespirations-Mutanten. Daher wurde die Existenz einer weiteren cytosolischen HPR2 postuliert (Kleczkowski und Randall, 1988). Timm et al. gelang es dann 2008 aus einer *hpr1*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* HPR2 zu identifizieren. In *Arabidopsis thaliana* zeigen die beiden Enzyme 51% Ähnlichkeit. Es konnte auch festgestellt werden, dass knock-out Mutanten der einzelnen HPR-Gene sich nur geringfügig von Wildtyp-Pflanzen unterschieden. Eine Doppelmutante, bei der sowohl HPR1 als auch HPR2 betroffen waren, zeigte eine deutliche Beeinträchtigung der Photosyntheseleistung unter Versuchsbedingungen, da keine Photorespiration mehr durchgeführt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass HPR2 dazu in der Lage ist, die Funktion von HPR1 fast vollständig zu übernehmen, und dass die Photorespiration nicht auf die Organellen beschränkt ist, sondern auch das Cytosol beteiligt ist. Man nimmt an, dass die cytosolische HPR2 im Falle voll ausgelasteter Photorespiration überschüssiges aus den Peroxisomen austretendes Hydroxypyruvat umsetzt.

1.6. *Coleus blumei*

Coleus blumei ist auch unter den Synonymen *Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd, *C. blumei* var. *verschaffeltii* (Lem.) Lem., *C. hybridus* hort. ex Voss, *C. pumilus* Blanco, *C. scutellarioides* (L.) Benth., *C. verschaffeltii* Lem., *Ocimum scutellarioides* L. und *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. bekannt (Janiak, 2007). In dieser Arbeit wird der gebräuchlichste Name *Coleus blumei* verwendet.

Coleus blumei ist eine Pflanze der Familie Lamiaceae, die in subtropischen Gebieten beheimatet ist. In Deutschland ist sie als Zierpflanze unter dem Namen Buntnessel verbreitet (Abb. 1.12.). Da sie den sekundären Pflanzeninhaltsstoff Rosmarinsäure in größeren Mengen enthält (bis zu 9% des Trockengewichtes), wurden Pflanzenzellkulturen zur Forschung genutzt (Petersen, 1994).

Coleus blumei und andere Arten der Gattung *Coleus* werden vor allem in den Heimatländern als traditionelle medizinische Zubereitung angewendet, z.B. zur Behandlung von Kopfschmerzen, Koliken oder Hämatomen (Ragasa et al., 2001). Pharmazeutisch interessant ist die Art *Coleus forskohlii* Briq., die Forskolin enthält, das antihypertensiv wirkt und die Kontraktivität des Herzmuskels steigert (Lindner et al., 1978).

Ein Problem, das sich in der Forschung mit *Coleus blumei* ergibt, ist der amphidiploide Chromosomensatz dieser Pflanze. Dies kann bei der Identifikation bestimmter Gene und Proteine Schwierigkeiten bereiten, und die Auswirkungen von Eingriffen in die Genregulation sind eventuell schwer zu beurteilen. Aus diesem Grund wurde bereits begonnen, *Melissa officinalis*, eine Lamiaceae mit normalem diploidem Chromosomensatz, als alternative Pflanze für Untersuchungen der Regulation der Rosmarinsäure-Biosynthese zu untersuchen.



Abb. 1.12.: Blätter der Buntnessel

1.7. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Mehrere putative Gene der Rosmarinsäure-Biosynthese wurden aus *Coleus blumei* kloniert und sequenziert. Hydroxy(phenyl)pyruvat Reduktase (H(P)PR) (Kim et al., 2004) und Rosmarinsäure Synthase (RAS) (Berger et al., 2006) sollten in Bezug auf ihre Bedeutung in der Rosmarinsäurebiosynthese untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten mehrere binäre Plasmid-Konstrukte erstellt und in *Agrobacterium rhizogenes* eingebracht werden. HPPR und RAS sollten als RNAi- und als Überexpressions-Konstrukte in Pflanzenmaterial (*Coleus blumei*) eingebracht werden; als Kontrollen dienten Transformanten mit leerem Vektor und ohne Vektor. Zusätzlich sollte die Methode der RNAi und die Transformation von Pflanzenmaterial mit *Agrobacterium rhizogenes* für dieses Labor etabliert werden. Gewonnenes transgenes Pflanzenmaterial in Form von Hairy Roots sollte diversen molekularbiologischen, enzymatischen und analytischen Tests unterzogen werden, um deren Transformationsergebnisse zu charakterisieren und die Ergebnisse anschließend zu diskutieren.

Da die HPR2 aus *Arabidopsis thaliana* bereits als rekombinantes Enzym in einem Expressionsvektor vorlag (Janiak, 2007) und teilweise charakterisiert wurde (Virginie

Berghoff, unveröffentlicht), sollte die Charakterisierung vervollständigt werden. Die Ergebnisse der Charakterisierung sollte mit der der rekombinanten HPPR aus *Coleus blumei* (Janiak, 2007) und der nativen HPPR aus *Coleus blumei* (Häusler et al., 1991; Häusler, 1989) verglichen werden, da die Enzyme 76,7 % Identität in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen. Dies sollte abklären, wie sich diese Enzyme in Hinblick auf ihr katalytisches Verhalten und ihre Substratspezifitäten unterscheiden.

2. Methoden

2.1. Erstellung von RNAi- und Überexpressions-Konstrukten

2.1.1. Die Vektoren pHANNIBAL und pART27 und die Auswahl der zu klonierenden Sequenzen

Für die Herstellung der RNAi- und Überexpressions-Konstrukte zur Transformation von Pflanzenmaterial zur Erzeugung gentechnisch veränderter Hairy Roots wurde die Kombination aus dem Klonierungsvektor pHANNIBAL (Wesley et al., 2001) und dem binären Vektor pART27 (Gleave, 1992) verwendet. pHANNIBAL dient der Herstellung von RNAi-Konstrukten (Abb. 2.1.).

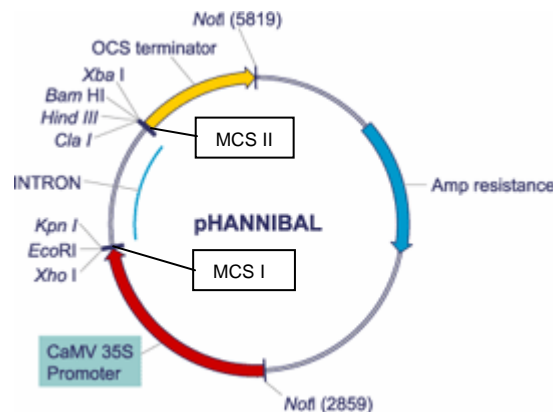


Abb. 2.1.: pHANNIBAL-Vektorkarte: Amp resistance: Ampicillin-Resistenz; CaMV 35S Promoter: konstitutiver Promotor aus dem Cauliflower Mosaic Virus; MCS I: Multiple Cloning Site mit den Restriktionsschnittstellen *XhoI*, *EcoRI* und *KpnI*; MCS II: Multiple Cloning Site mit den Restriktionsschnittstellen *Clal*, *HindIII*, *BamHI* und *XbaI*; Intron: Intron 2 des PDK (Pyruvat Orthophosphat-Dikinase) Gens aus *Flaveria trinervia*; OCS terminator: Terminator des Octopin-Synthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*; Restriktionsschnittstelle *NotI* zur Subklonierung der RNAi-Konstrukte in einen binären Vektor.

RNAi-Konstrukte bestehen aus zwei komplementären Teilsequenzen eines Zielgens, die in „sense“ und „antisense“ Richtung über ein Intron verbunden sind. Wird dieses Konstrukt in der Pflanze später transkribiert, hybridisieren die komplementären RNA-Stränge und bilden zusammen mit dem Intron eine Haarnadel-Struktur. Diese Doppelstrang-RNA führt dann zu dem natürlichen Prozess der RNA Interferenz (RNAi) oder des PTGS (posttranscriptional gene silencing). Dieser Prozess wurde in der Einleitung unter 1.1. bereits ausführlich beschrieben. Somit erhält man einen sequenzspezifischen Abbau der Ziel-mRNA.

Der pHANNIBAL-Vektor ist speziell dafür konstruiert, die Teilsequenz eines Zielgens mithilfe der unterschiedlichen Schnittstellen in MCS I und MCS II einmal in „sense“-Richtung und einmal in „antisense“-Richtung in den Vektor einzubringen. Man wählt ein mindestens 300 bp langes Stück seines Zielgens aus und fertigt dafür Primer an, die einmal entsprechende Schnittstellen für MCS I enthalten und einmal geeignete Schnittstellen für MCS II. In zwei verschiedenen PCR-Reaktionen werden nun zwei PCR-Produkte des Zielgens erstellt. Nach einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen können die Stücke nacheinander in die beiden MCS ligiert werden. Das PCR-Stück, welches die Restriktionsschnittstellen für MCS I enthält wird in „sense“-Richtung und das PCR-Stück mit den Restriktionsschnittstellen für MCS II wird in „antisense“-Richtung in den Vektor eingebaut (Helliwell und Waterhouse, 2003).

Das PDK-Intron dient einerseits als Platzhalter, um die Klonierung der „sense“-„antisense“-Konstrukte zu erleichtern, andererseits ist es notwendig, um eine gewisse Stabilität des Konstrukts in *E. coli* zu erzielen. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Verwendung eines funktionalen Introns als Platzhalter zu einer höheren Effizienz beim „Silencing“ führt (Wesley et al., 2001).

Zur Wahl der Teilsequenz des Zielgens sind einige Regeln zu beachten. Die Teilstücke sollten eine Länge von 300 bis 700 bp aufweisen. Die Zielregion sollte sich etwa 50 bis 100 bp vom Startcodon abwärts befinden. Die Sequenz sollte - ähnlich wie bei Primern - einen G+C-Gehalt >50 % aufweisen. Wiederholungen von Nukleotiden ab 3 aufwärts sollten vermieden werden. Zusätzlich muss die Zielsequenz spezifisch für das Gen sein, dessen Expression man unterdrücken möchte, um unspezifisches „Silencing“ zu verhindern. Man sollte daher Motive meiden, die in bestimmten Proteinklassen spezifisch vorkommen.

In dieser Arbeit wurden die Gene Hydroxypyruvat Reduktase (HPPR) und Rosmarinsäure Synthase (RAS) für die RNAi-Konstrukte ausgewählt, um die Auswirkungen einer verringerten oder unterdrückten Expression dieser Gene auf die Rosmarinsäurebiosynthese zu untersuchen.

Für die HPPR wurde ein 646 bp langes Stück zur RNAi-Konstruktion ausgewählt (Abb. 2.2.). Als Vorlage für die PCR (siehe 2.1.2.) diente ein pET15b Vektor mit dem vollständigen offenen Leserahmen der HPPR-cDNA aus *Coleus blumei*. Mit dem Primerpaar HPPR 1f/HPPR 2rc (siehe 3.3.) wurde ein PCR-Stück amplifiziert und in die Schnittstellen *KpnI/EcoRI* in „sense“-Richtung in den Vektor eingebracht (siehe 2.1.5. Restriktionsverdau; 2.1.7. Ligation; 2.1.8. Transformation; 2.1.11. Minipräp). Das mit dem Primerpaar HPPR 3f/HPPR 4rc (siehe 3.3.) gewonnene PCR-Stück wurde in die Schnittstellen *HindIII/BamHI* in „antisense“-Richtung in den pHANNIBAL-Vektor ligiert (siehe 2.1.7.).

```

atc gaggcgattggcggtttgatgatgtgcccgatgagcacctacttggagcaagagcttgacaagcgggttcaagct
ctttcggttactggactcagccggcgagcgcgacttcctcgctctgcaggccgagtctatccgcgcggtggttggga
att cgaacgcccgtgccgatgctgagttgatcgacgcactgccgaaactggagattgtgtcgagcttttagcgtgggt
ctggataaggttgacttgatcaagtgtgaggagaagggggttagggttaccaacacgcccgatgtgctgacggatga
cgtcgcggtattggcgatcgggttgattttggcggttttgaggcggatttgtgagtgatgataagtatgtgaggagag
gggcgtggaaatttgggagacttcaagttgacgactaagttcagcggtaaaagagttggcatcataggattgggcaga
atcgggttagcagttgctgagcgagcagagggcatttgattgtccaatcagttacttttcaagatccaagaaaccaa
cacaactacacatactatggcagcggttgtagaattggcggtcaaacagtgacatcctagtcgtagcatgtccctga
ctccagaaacaactcatattatcaatcgagaagtaatcgatgctctgggtccaaagggagttctcatcaacattgga
aggggacctcatgttgatgagcccgaactgggtgctgctcttgtggagggccgtctgggtggcgctggtcttgatgt
attcgaaaggggaaccagaggtaccggaagaagctcttcggtctggaaaatgttgcctgttgccacatgtaggagtg
gcaccgtggaaacgcgtaaagtgatggctgatcttgcgtcggaacttggaagctcacttctccggcaagcctctc
ttaactccagtagtttga
  
```

Abb. 2.2.: Sequenz der HPPR; Start- und Stoppcodon sind grün markiert; der blau markierte Bereich wurde für die Herstellung der RNAi-Konstrukte gewählt.

Primer für die Amplifikation der HPPR-Teilsequenzen für RNAi-Konstrukte:

HPPR 1f:	5' – CAG GAT CCG AAC GCC GGT GCC	(<i>EcoRI</i>)
HPPR 2rc:	5' – CGA AAG GGA ACC AGA GGT ACC GG	(<i>KpnI</i>)
HPPR 3f:	5' – CAG AAT TCG AAC GCC GGT GCC	(<i>BamHI</i>)
HPPR 4rc:	5' – CGA AAG GGA ACC AGA GAA GCT TCG C	(<i>HindIII</i>)

Zur Herstellung der RAS RNAi wurde ein 645 bp langes Stück der RAS (Abb. 2.3.) in „sense“-Richtung mit RAS 1for/RAS 2rev (siehe 3.3.) mit den Schnittstellen *EcoRI* und *KpnI* in pHANNIBAL ligiert (siehe 2.1.5. Restriktionsverdau; 2.1.7. Ligation; 2.1.8. Transformation; 2.1.11. Minipräp). Das „antisense“-Stück wurde mit den Primern RAS 3for und RAS 4rev (siehe 3.3.) amplifiziert und in die Schnittstellen *BamHI* und *HindIII* in den Vektor gebracht. Als Vorlage diente hier pET15b mit der Volllängen-Sequenz der RAS aus *Coleus blumei*.

```

ATGAAGATAGAAGTCAAAGACTCGACTATGATAAAGCCGTCGGCGGAGACGCCGGGGGGGAGTTTGTGGCTCTCAAA
TTTGGACTTGTGTGCGCCGGCCAACCTACCACACCCTCAGCGTGCACTTCTACAGCCACGACGGCTCCGACAACCTTCT
TCGACGCGGGCGGGGTTGAAGGAGTCGCTCAGCCGAGCTCTGGTTGAGTTCTACCTTACGCGGGGAGGTTGAAGCTG
AACGGCAACCGCCTCGAGATCGACTGTAACAACGAGGGGTTGCTGTTGGTGGAGGCGGAGTGCGACGGCGCGTTGGA
TGAGCTCGGCGACTTCGCCCCCGCCCGGAGCTCAACCTCATCCCTAAAGTGGATTATTCTCGAGGAATTTCCACAT
ACCCTCTCATGGTTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAATGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGAAACGAGCACCCTTA
TCCGACGGCGTCGCGGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCCACCTCAGCCGCGGCGCCCCCGCCCTACCCCGCT
GCCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTCGCAACCCACCGCAGCCGAGTTTCAGCCACGCGGAGTACCAGCCTC
CTCCCACTCTCGAAAACCTCTTCCCCACACCGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCCGCGACCAGCTCAAC
TCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCCCGCCGACGGCGGCGCCGCAAATCCTACAGCACGTTTCGAGGTTCTTGC
CGGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGGCTGCGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTCCACATCCCCCTTCG
ACGGCCGCGGCGAGGCTGCAGCTGCCGCCGGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGC
GGCGAGATCGAGTCGAACGCTGGAATTACGCCGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGCTGGATGAGGACTA
CCTGCGATCGTCGATCGATTTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTGGCGCAGGGAGCTCACAGTTTCAGGT
GCCCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTGCCGATTTACGAGCCGGATTTCCGGGTGGGGGAAGGCGGTGTAT
ATGGGGCCGTGGGCGGCGCCGTTTGAAGGGAAGAGCTACCTTCTGCCTAACCCGGAAGATGGCAGCTTGTTCGT
CTCCATCACTCTGCATAAGCAACACATGGAGAGATTTGAGAAGTTGTTTTATGAGATTGTA

```

Abb. 2.3.: Sequenz der RAS; Start- und Stoppcodon sind grün markiert; der blau markierte Bereich wurde für die Herstellung der RNAi-Konstrukte gewählt; der orange markierte Bereich enthält das DFGWG-Motiv der BAHD-Acyltransferasen und wurde deshalb nicht RNAi-Konstrukte in Betracht gezogen, um unspezifische RNAi-Effekte zu vermeiden.

Primer für die Amplifikation der RAS-Teilsequenzen für RNAi-Konstrukte:

RAS 1for: 5' – ATG AAT TCA TTT CCA CAT ACC CTC TC (*EcoRI*)
RAS 2rev: 5' – ATG GTA CCA TCG ATC GAC GAT CGC (*KpnI*)
RAS 3for: 5' – ATG GAT CCA TTT CCA CAT ACC CTC TC (*BamHI*)
RAS 4rev: 5' – TAT AAG CTT ATC GAT CGA CGA TCG C (*HindIII*)

Der pHANNIBAL-Vektor kann durch die Wahl der Schnittstellen auch für die Herstellung einer Expressionskassette für Überexpressionsexperimente verwendet werden, da er den konstitutiven Promoter CaMV35S enthält. Dafür wählt man die vordere Schnittstelle aus MCS I und die hintere Schnittstelle aus MCS II, so dass das PDK-Intron aus dem Vektor herausgeschnitten wird. In diese Restriktionsschnittstellen kann dann eine cDNA in Volllänge eingebracht werden (siehe 2.1.5. Restriktionsverdau; 2.1.7. Ligation; 2.1.8. Transformation; 2.1.11. Minipräp).

Für die HPPR wurde die Schnittstellenkombination *EcoRI/BamHI* verwendet und für die RAS *XhoI/BamHI*. Die jeweils zuerst genannte Restriktionsschnittstelle befindet sich vor dem Startcodon des jeweiligen Gens, die zweite Restriktionsschnittstelle hinter dem Stoppcodon. Durch die Wahl von zwei verschiedenen Schnittstellen wird sicher gestellt, dass das nicht benötigte PDK-Intron ausgeschnitten wurde und dass die Gene in der richtigen Orientierung in den pHANNIBAL-Vektor ligiert wurden. Eine Überexpression der cDNAs in der Pflanze durch den CaMV35S-Promotor ist somit gewährleistet.

Primer für die Amplifikation des vollständigen offenen Leserasters der HPPR und der RAS zur Ligation in pHANNIBAL:

HPPR *XhoI* for: 5' – TAT GAA TTC ATG AAG ATA GAA GTC AAA G
HPPR *BamHI* rev: 5' – GAT GGA TCC TCA AAT CTC ATA AAA CAA C
RAS *EcoRI* for: 5' – ATA CTC GAG ATG GAG GCG ATT GGC
RAS *BamHI* rev: 5' – TAT GGA TCC TCA AAC TAC TGG AGT TAA GAG

pHANNIBAL kann nicht direkt zur Transformation von Pflanzenmaterial mit Hilfe von Agrobakterien verwendet werden, da der Vektor keine Sequenzen für „right border“ (RB) und „left border“ (LB) aufweist, welche die Agrobakterien benötigen, um genetisches Material in das Pflanzengenom zu integrieren. Deshalb wird die in pHANNIBAL erstellte RNAi- bzw. Überexpressionskassette in den binären Vektor pART27 eingeführt (Abb. 2.4.), wobei die *NotI*-Schnittstellen des pHANNIBAL und des pART27 zum Tragen kommen (siehe 2.1.5. Restriktionsverdau; 2.1.6. „Cippen“; 2.1.7. Ligation; 2.1.8. Transformation; 2.1.11. Minipräp). pART27 enthält zusätzlich zu den RB- und LB-Sequenzen den Selektionsmarker Kanamycinresistenz, mit dessen Hilfe transformiertes Pflanzenmaterial selektiert werden kann.

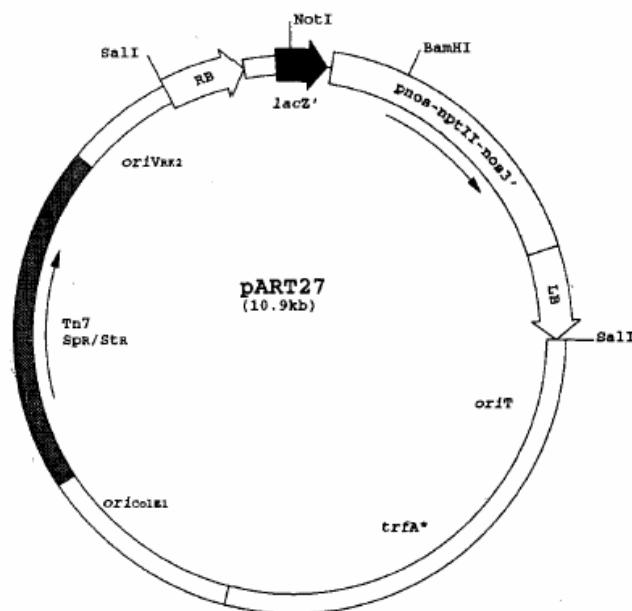


Abb. 2.4.: Vektorkarte für pART27: lacZ: Sequenz für das β -Galactosidase-Protein zur Blau-Weiß-Selektion; RB: „right border“, Erkennungssequenz für Gentransfer durch Agrobakterien; LB: „left border“, Erkennungssequenz für Gentransfer durch Agrobakterien; pnos-nptII-nos3': kodiert für eine Aminoglycosid Phosphotransferase, welche Kanamycinresistenz in Pflanzen hervorruft; Tn7 Sp^R/St^R: Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz zur Selektion in Bakterien; ori_{ColE1}: Replikationsursprung für „multicopy“-Plasmide; oriT: Startpunkt der Replikation beim Transfer der T-DNA (horizontaler Gentransfer); *NotI*-Schnittstelle: zur Ligation der Expressionskassette aus pHANNIBAL.

2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für Klonierungen

Die Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR für engl. *polymerase chain reaction*) ist eine Methode, die 1985 von Kary Banks Mullis entwickelt wurde, um einen bestimmten Abschnitt der DNA *in vitro* zu vervielfältigen, ohne einen lebenden Organismus, wie z.B. *Escherichia coli* oder Hefe, zu benutzen (Saiki et al., 1985).

Der Ablauf eines PCR-Zyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen:

(1) Denaturierung: Dabei wird der PCR-Ansatz auf 95 °C erhitzt, um doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufzuschmelzen.

(2) Annealing: Beim Abkühlen des Ansatzes auf die Primer-spezifische Annealingtemperatur lagern sich die Primer (Oligonukleotide von 20-30 Basen Länge) an die entsprechenden einzelsträngigen DNA-Abschnitte an, welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren und welche komplementär zu den Primern sind.

(3) DNA-Synthese: Die hitzestabile *Taq*-Polymerase ergänzt den Gegenstrang bei einer Temperatur von 72 °C mit einer Geschwindigkeit von ca. 2000 Basen/min in 5'→3'-Richtung. Bei jedem dieser Zyklen verdoppelt sich die Menge des zu amplifizierenden Produkts, bis dieser exponentielle Anstieg der Vervielfältigung ein Plateau erreicht, bei dem mehr Primer-Template-Komplexe vorliegen, als die Polymerase in der Synthesezeit amplifizieren kann.

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Es kam die GoTaq Flexi DNA Polymerase und die dazu gehörigen Reagenzien der Firma Promega zum Einsatz. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

1,0	µl	Template
5,0	µl	5x Puffer
2,5	µl	MgCl ₂ 25 mM
0,5	µl	forward Primer 10 pmol/µl
0,5	µl	reverse Primer 10 pmol/µl
0,5	µl	dNTPs 10 mM
0,1	µl	GoTaq-Polymerase 5u/µl
15,0	µl	steriles Wasser
25,0	µl	Gesamtansatz

Für die PCR der Gesamtsequenz der HPPR und RAS wurde der High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1,0	µl	Template
2,5	µl	10x Puffer + MgCl ₂
0,5	µl	dNTP-Mix
0,5	µl	forward Primer
0,5	µl	reverse Primer
0,1	µl	HiFi-Enzyme Mix
20,0	µl	steriles Wasser
25,0	µl	Gesamtansatz

Zur Amplifikation von Fragmenten bis zu einer Größe von etwa 900 bp wurde folgendes Programm des Thermocyclers (Mastercycler Gradient, Eppendorf) verwendet:

95 °C	1 min	} x 36 Zyklen
95 °C	45 s	
X °C	45 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	5 min	
4 °C	Reaktionsstopp	

X°C entspricht den Annealingtemperaturen der einzelnen Primerpaare:

HPPR 1f/HPPR 2rc:	58 °C
HPPR 3f/HPPR 4rc:	58 °C
RAS 1for/RAS 2rev:	55 °C
RAS 3for/RAS 4rev:	53 °C
HPPR <i>Xho</i> I for/HPPR <i>Bam</i> HI rev:	56 °C
RAS <i>Eco</i> RI for/RAS <i>Bam</i> HI rev:	59 °C

2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Analyseverfahren, mit dessen Hilfe die Größe von DNA-Fragmenten bestimmt werden kann. Bei dieser Methode nutzt man elektrische Spannung, um negativ geladene DNA-Moleküle durch eine poröse Matrix (das Agarose-Gel) wandern zu lassen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts des DNA-Fragmentes. Durch den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard, der DNA-Moleküle bekannter Größe enthält, kann die Größe von unbekannten DNA-Fragmenten bestimmt werden. Der Nachweis der DNA erfolgt mit Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaarstapel des DNA-

Doppelstrangs und fluoresziert unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm. Diese Fluoreszenz wird mit einer Kamera fotografisch dokumentiert.

Für ein 0,7%iges Agarose-Gel werden die Menge von 0,7 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE-Puffer (5,4 g/L Tris; 2,75 g/L Borsäure; 0,93 g/L EDTA) aufgekocht, mit 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (1%ig) versehen und in einen Gelträger gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird es in eine Gelkammer mit 0,5x TBE-Puffer gesetzt. Zu den aufzutragenden Proben wird eine entsprechende Menge an 6x Loading Dye (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 60 mM EDTA; 60% Glycerin; 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylencyanol FF) pipettiert und die Proben anschließend in die Geltaschen gegeben. Hier wurde meist ein Gesamt-PCR-Ansatz von 25 µl mit 5 µl 6x Loading Dye versehen. An das Gel wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt. Die Laufzeit betrug etwa 60 Minuten.

2.1.4. Gelextraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Für die Aufreinigung bzw. Extraktion von PCR-Produkten und Vektoren aus Agarosegel wurde das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Für die Gelextraktion wurden 200 µl/100 mg Agarosegel NT-Puffer zu dem ausgeschnittenen Gelstück mit der gewünschten DNA gegeben und bei 50 °C unter gelegentlichem leichtem Schütteln inkubiert bis das Gelstück aufgelöst war. Für die Aufreinigung von PCR-Ansätzen wurden 200 µl pro 100 µl PCR-Ansatz NT-Puffer direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Ab diesem Punkt wurde für die Aufreinigung und die Extraktion dasselbe Protokoll befolgt. Die Lösung mit der DNA wurde auf ein NucleoSpin-Säulchen gegeben und bei 11.000 g für eine Minute zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die DNA an das Säulenmaterial. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit der gebundenen DNA mit 600 µl NT3-Puffer gewaschen und wieder für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Um überschüssigen NT3-Puffer vom Säulenmaterial zu entfernen, wurde erneut bei 11.000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Die DNA auf dem Säulenmaterial wurde schließlich mit 20-50 µl sterilem Wasser für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und mit einer Zentrifugation von einer Minute bei 11.000 g von der Säule eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.1.5. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen kann DNA an einer definierten, vom Enzym abhängigen Erkennungssequenz geschnitten werden. Die Erkennungssequenzen sind etwa vier bis acht Basenpaare lang und sind in ihrer Sequenz meist palindromisch. Die Enden einer Schnittstelle können entweder glatt („blunt ends“) sein, das heißt, beide Stränge der

DNA werden an derselben Stelle geschnitten, oder überstehen („sticky ends“), das heißt, es kann entweder das 3'- (3'-Überhang) oder das 5'-Ende (5'-Überhang) länger als das andere sein.

Ein Standardverdau setzt sich wie folgend zusammen:

X	µl	DNA (0,2-1 µg)
1,5	µl	10x Puffer nach Herstellerangaben
0,5	µl	Restriktionsenzym (10 u/µl)
ad 15,0	µl	steriles Wasser
15,0	µl	Gesamtansatz

Für einen Doppelverdau mit zwei verschiedenen Enzymen wurden die geeigneten Pufferbedingungen laut Hersteller verwendet und statt einem Restriktionsenzym zwei verwendet. Die Wassermenge wurde entsprechend angeglichen. Der Verdau wurde mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wenn nötig, wurden die Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben inaktiviert.

2.1.6. Dephosphorylieren von aufgeschnittenen Vektoren

Die „calf intestine phosphatase“ (CIP) katalysiert die Hydrolyse freier Phosphatgruppen. Sie dephosphoryliert DNA, RNA und Proteine. Dieser Vorgang wird wegen der Abkürzung des Enzyms auch „Cippen“ genannt.

Vektoren, die mit nur einem Restriktionsenzym aufgeschnittenen wurden, wie pART27 mit *NotI*, mussten, um Religationen ohne Insert zu vermeiden, „gecippt“ werden. Da die „calf intestine alkaline phosphatase“ (CIAP, Fermentas) in vielen Puffern der Restriktionsenzyme aktiv ist, wurde nach Herstellerangaben das „Cippen“ direkt im inaktivierten Restriktionsverdauansatz durchgeführt. So wurden z.B. zu einem Restriktionsansatz von 15 µl Gesamtvolumen 0,2 µl CIAP (1u/µl) zugefügt und bei 37 °C eine Stunde inkubiert.

2.1.7. Ligationen

Bei der Ligation werden 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Ende einer oder mehrerer Nukleinsäurestücke mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden. In dieser Arbeit wurde die Ligation zum Einklonieren von PCR-Fragmenten in Vektoren genutzt.

Für einen Ligationsansatz wurden Vektor und Insert etwa in dem Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die DNA-Konzentrationen wurden zuvor mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

x	µl	Vektor
y	µl	Insert
1,5	µl	10x Puffer vom Hersteller
2,0	µl	T4-DNA-Ligase (5 u/µl)
Ad 15,0	µl	steriles Wasser
15,0	µl	Gesamtansatz

Der Ligationsansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

2.1.8. Transformation von *E. coli*

Escherichia coli (*E. coli*) wurden mit Hilfe des Roti-Transform-Kits (Roth) für Transformationen kompetent gemacht.

Ein 100 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml LB-Medium wurde mit 0,5 ml einer frischen Übernachtskultur (siehe 4.1.9.) eines *E. coli*-Stammes angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C im Schüttler bei 220 UpM inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 bis 0,7 erreicht hatten. 1,9 ml-Portionen der Bakteriensuspension wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße gefüllt und die Bakterien bei 3.000 g für fünf Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Bakterien wurden anschließend in 100 µl eiskaltem LB-Medium resuspendiert. Zu den resuspendierten Bakterien wurden 90 µl eiskaltes Roti-Transform 1 und 10 µl zimmerwarmes Roti-Transform 2 gegeben und gemischt. Darauf folgte eine Inkubation von fünf Minuten auf Eis. Die nun kompetenten Bakterien konnten direkt für eine Transformation verwendet werden oder für längere Zeit bei -80 °C gelagert werden.

Zur Transformation wurde 1-5 ng Vektor zu den kompetenten Bakterien gegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien konnten dann auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum und eventuell X-Gal (20 µl 50 mg/ml X-Gal in DMF pro Platte) und IPTG (100 µl 0,1 M IPTG pro Platte) für Blau-Weiß-Selektion ausgestrichen werden. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden am nächsten Tag zum Screening als Übernachtskultur angeimpft. Der Transformationserfolg wurde mit Hilfe einer Plasmidpräparation, anschließendem Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.1.9. Ansetzen von Übernachtskulturen

Für Übernachtskulturen wurden mit einem sterilen Zahnstocher Kolonien von einer Agar-Platte gepickt oder Bakterien aus einer Glycerin-Dauerkultur entnommen und für *E. coli* in 4 ml LB-Medium in Kulturröhrchen bei 37 °C über Nacht im Schüttler bei 220 UpM inkubiert. *A. rhizogenes* wurde in 10 ml YMB-Medium in 100 ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 26 °C und 108 UpM etwa 36-48 Stunden inkubiert.

Das Medium wurde vor der Inkubation - falls nötig - mit entsprechendem Antibiotikum versehen.

2.1.10. Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung von untransformierten und transformierten Bakterien (*E. coli* und *A. rhizogenes*) wurden 425 µl Übernachtskultur in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß gefüllt, gut mit 75 µl sterilem Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zum erneuten Animpfen von Kulturen wurde von der gefrorenen Glycerin-Dauerkultur etwas Material mit einer Impföse oder einem sterilen Zahnstocher entnommen und auf Medium ausgebracht.

2.1.11. Plasmid-Präparation (Minipräp)

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Protokoll nach Birnboim und Doly (1979) angewendet.

Dazu wurden 2 ml (*E. coli*) oder 10 ml (*A. rhizogenes*) Bakterien-Suspension für fünf Minuten bei 2.300 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Suspensions-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) rückgelöst. Zum Aufschließen der Zellen wurden 300 µl Lyse-Puffer (200 mM NaOH; 1% SDS) zugegeben und alles gut gemischt. Zusätzlich zur Lyse der Zellen wurde die frei werdende genomische DNA durch den hohen pH-Wert der Natronlauge denaturiert. Anschließend wurde durch die Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (3 M Natriumacetat, pH 5,5) renaturiert. Die genomische DNA und die Proteine bilden mit SDS und Natriumacetat Komplexe, die ausfallen. Dieser Vorgang wird durch eine Inkubation auf Eis für fünf Minuten begünstigt. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 15.800 g wurden die Protein- und DNA-Komplexe sedimentiert. Der Überstand enthält so vorwiegend die Plasmid-DNA. 800 µl dieses Überstandes wurden mit 80 µl 3 M Natriumacetat und 560 µl Isopropanol versehen, um die Plasmid-DNA zu fällen. Die Plasmid-DNA wurde durch eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 15.800 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet bis keine Ethanolreste mehr vorhanden waren. Die Plasmid-DNA wurde in 20-50 µl sterilem doppelt destilliertem Wasser oder 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Die Plasmid-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.1.12. QIAprep Plasmid-Präparation

Sollte ein kloniertes DNA-Stück sequenziert werden, wurde die Plasmid-Präparation mit dem QIAprep Miniprep Kit von QIAGEN durchgeführt.

Dazu wurden 2 ml (*E. coli*) Bakterien-Suspension für fünf Minuten bei 2.300 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Suspensions-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) rückgelöst. Zum Aufschließen der Zellen wurden 250 µl Lyse-Puffer (200 mM NaOH; 1% SDS) zugegeben und alles gut gemischt. Dann wurden 350 µl N3-Puffer zugegeben, sofort sanft gemischt und anschließend bei 13.000 UpM für 10 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin Column gegeben und für 60 Sekunden bei 15.800 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde zum Waschen mit 500 µl PB-Puffer befüllt und für 60 Sekunden bei 15.800 g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde erneut gewaschen mit 750 µl PE-Puffer, mit einer anschließenden Zentrifugation von 60 Sekunden bei 15.800 g. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Um überschüssigen Waschpuffer von der Säule zu entfernen, wurde nochmals für 60 Sekunden bei 15.800 g zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50 µl steriles Wasser auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation von 60 Sekunden bei 15.800 g von der Säule gewonnen. Mit dem UV/VIS-Spektrometer wurde die Konzentration der Plasmid-DNA bestimmt und die Plasmid-DNA dann für Sequenzierungen verwendet.

2.1.13. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried) durchgeführt. Plasmide sollten eine Konzentration von 50-100 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl, Primer von 2 pmol/µl in 15 µl aufweisen.

2.2. Transformation von Pflanzenmaterial mit Hilfe von *Agrobacterium rhizogenes*

2.2.1 Transformation von *Agrobacterium rhizogenes*

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von fremdem genetischem Material in Zellen, hier Bakterien. Die Fähigkeit von Bakterien, Fremd-DNA aufzunehmen, wurde erstmals 1928 von Griffith beobachtet und 1944 von McCarty und Avery als Transformation bezeichnet. Um fremde DNA aufnehmen zu können, müssen die Bakterien kompetent sein. Für einige Bakterienarten ist dies auf natürlich Art der Fall, im Labor muss die Kompetenz der Bakterien künstlich herbeigeführt werden. Die dabei angewendeten Methoden sind der

Hitzeschock und die Elektroporation. Beim Hitzeschock werden die Bakterien durch eine kurze Kältebehandlung bei Anwesenheit von divalenten Kationen und anschließender, kurzzeitiger Erwärmung zugänglich für Plasmid-DNA. Bei der Elektroporation werden die Bakterien durch ein elektrisches Feld durchlässig für Plasmid-DNA und nehmen diese auf.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Agrobakterien durch Hitzeschock kompetent gemacht und transformiert.

2-4 ml Übernachtskultur von *A. rhizogenes* wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 10.000 g für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, um das lose Pellet nicht zu stören. Man resuspendiert anschließend das Pellet in 100 µl eiskaltem 20 mM CaCl₂, gab etwa 3 µl Plasmid-DNA zu und mischte vorsichtig. Das Reaktionsgefäß mit den Bakterien wurde für fünf Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml YMB-Medium wurde der Ansatz für zwei Stunden bei 26 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden daraufhin für zwei Minuten bei 3.000 g sedimentiert und der Überstand vorsichtig bis auf etwa 50 µl entfernt. Das Pellet wurde in den 50 µl Restmedium resuspendiert und auf YMB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausgebracht. Die Platten mit den transformierten *A. rhizogenes* wurden für etwa 36-48 Stunden bei 26 °C inkubiert.

2.2.2. *Coleus blumei*-Pflanzenkulturen

Die aseptischen Pflanzenkulturen wurden aus Samen herangezogen und existieren seit mindestens 20 Jahren. Die einzelnen Linien stammen ursprünglich von jeweils einem Samen ab.

Die *Coleus*-Pflanzenkulturen wurden steril in Gläsern mit Schraubdeckel auf CB2OH-Agar kultiviert. Alle vier bis sechs Wochen wurden unter sterilen Bedingungen Stecklinge mit Knospe und einem Blattpaar abgeschnitten und in eine neues Glas überführt. Da *Coleus blumei* leicht Adventivwurzeln bildet, reichte es aus, den Stängel in den Agar zu stecken, um die Kultur zu erhalten. Die Pflanzen wurden im Dauerlicht bei 24 °C kultiviert.

2.2.3. Transformation von *Coleus blumei*-Blättern mit *Agrobacterium rhizogenes*

Für die Transformation von *Coleus blumei*-Blättern mit transformierten *Agrobacterium rhizogenes* zur Erzeugung von gentechnisch veränderten Hairy Roots wurden zuerst Übernachtskulturen von Agrobakterien mit den entsprechenden pART27-Konstrukten angeimpft. Nach etwa 36 bis 48 Stunden konnten Blätter steriler *Coleus blumei*-

Pflanzenkulturen damit infiziert werden. Dazu schnitt man Blätter ab und pipettierte pro Blatt etwa 10 µl Bakteriensuspension auf die Blattunterseite. Zusätzlich wurden mit der Pipettenspitze leicht Verwundungen an den Blättern hervorgerufen damit die Bakterien besser in die Pflanze eindringen konnten und deren Transformationsmechanismus induziert wurde. Vier bis fünf der infizierten Blätter wurden mit dem Blattstiel möglichst aufrecht in auf eine Petrischale (Durchmesser 94 mm) mit CB2OH-Agar gesteckt. Dies verhinderte ein unnötig starkes und unerwünschtes Wachstum der Agrobakterien auf den CB2OH-Platten. Die Blätter wurden 48 bis 52 Stunden bei Raumtemperatur und herrschendem Tag-Nacht-Rhythmus inkubiert. Dann wurden die Blätter in sterilem Leitungswasser mit 500 µg/ml Cefotaxim gewaschen, mit sterilem Zellstoff leicht getrocknet und auf CB2OH-Agarplatten mit 500 µg/ml Cefotaxim wieder ausgebracht. Die Waschungen mit Antibiotikum wurden alle zwei Tage wiederholt oder wenn wieder ein deutliches Agrobakterienwachstum zu sehen war. Nach ein bis drei Wochen waren die ersten Hairy Roots sichtbar, meist in der Nähe des Blattstiels oder von Blattadern. Ab einer Länge von etwa 0,5 bis 1 cm wurden die Hairy Roots unter sterilen Bedingungen vorsichtig mit einer Federpinzette und einem Skalpell abgeschnitten und einzeln auf CB2OH-Agarplatten (Durchmesser 60 mm) mit 500 µg/ml Cefotaxim und - wenn nötig - mit dem Selektionsmarker Kanamycin (60 µg/ml) ausgebracht. Die Platten wurden etwa ein- bis zweimal die Woche erneuert, um ein Wachstum der Agrobakterien zu unterbinden. Waren Agrobakterien gewachsen, wurden die Hairy Roots ebenfalls einer Waschung mit Cefotaxim unterzogen. Die Hairy Roots wurden bei 26 °C im Dunkeln kultiviert bis sie eine entsprechende Größe hatten, um einen Teil zur weiteren Kultivierung als Suspensionskultur zu entnehmen. Um die Agrobakterien vollständig von den Hairy Roots zu eliminieren, wurde dem CB2OH-Flüssigmedium 500 µl/ml Cefotaxim zugesetzt und die Kulturen bei 26 °C bei 110 UpM geschüttelt. Das Medium mit dem Antibiotikum wurde für zwei bis drei Wochen jeden zweiten Tag erneuert. Danach waren die Kulturen in der Regel frei von Agrobakterien. Dies wurde anhand einer PCR auf das Agrobakteriengen *virC* überprüft. Waren die Kulturen frei von Agrobakterien wurden sie in CB2OH-Flüssigmedium ohne Antibiotikum weiterkultiviert. Alle 14 Tage wurden 0,5 g Pflanzenmaterial in frisches Medium überführt. Nach acht bis zehn Wochen war die Hairy Root-Flüssigkultur stabil und für Experimente zu nutzen (Abb. 2.5.).

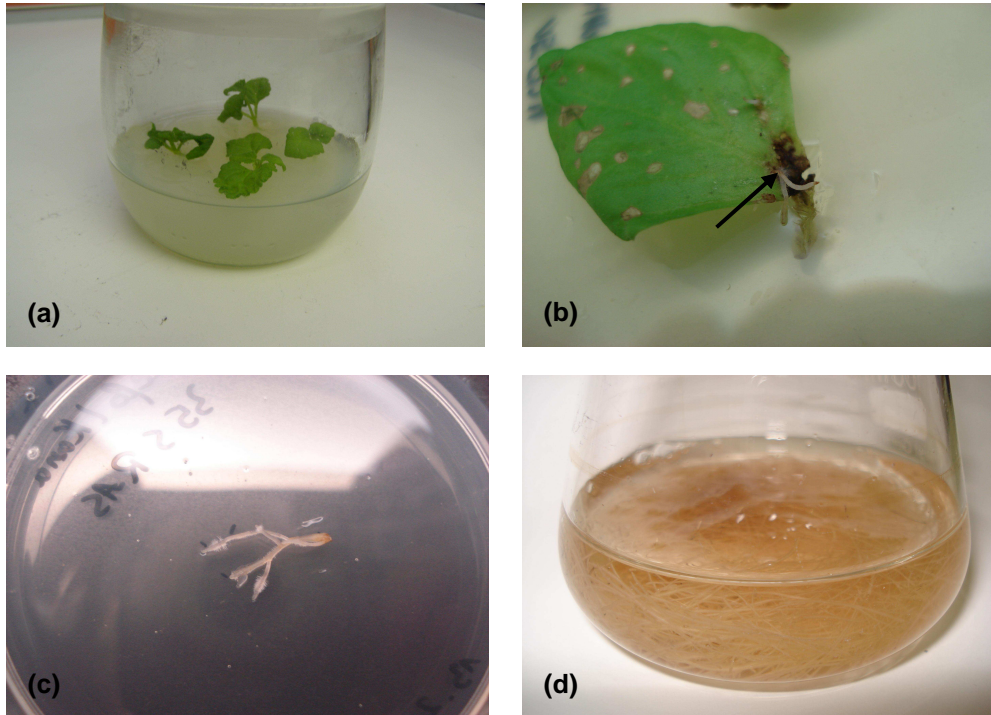


Abb. 2.5.: (a) aseptische Pflanzenkultur von *Coleus blumei*; (b) Infiziertes Blatt mit ersten Hairy Roots (siehe Pfeil); (c) Abgeschnittene Hairy Root nach etwa 10 Tagen auf Festmedium; (d) Flüssigkultur der Hairy Roots

2.3. Molekularbiologische Analyse der transgenen Hairy Roots

2.3.1. DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial für PCR

Zur Isolation von DNA aus Pflanzenmaterial als Template für PCR wurde ein leicht modifiziertes Protokoll von Murray und Thompson (1980) durchgeführt.

Von dem Pflanzenmaterial wurden aus den Flüssigkulturen kleine Proben entnommen, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem kleinen Pistill in flüssigem Stickstoff gemörsert. Zum gefrorenen Material wurden 300 µl 2x CTAB-Puffer (2% w/v CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA) gegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde für mindestens 10 min bei 65 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Es wurden 300 µl Chloroform zugegeben und die beiden Phasen gut gemischt. Durch eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 15.800 g werden die Phasen wieder getrennt. Die obere wässrige Phase mit der DNA konnte in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Die darin enthaltene DNA wurde durch Zugabe von einem Volumen (300 µl) Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugieren für fünf Minuten bei 15.800 g wurde die gefällte DNA pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA

wurde in 50 µl 0,1xTE-Puffer mit RNase A (100 µg/ml) rückgelöst. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.2. Kontroll-PCRs auf verschiedene Zielsequenzen

Mit dieser nach 2.3.1. isolierten DNA wurden die Hairy Roots auf bakterielle Verunreinigung und auf die Richtigkeit der Transformation überprüft. *virC* diente zur Überprüfung auf bakterielle Verunreinigung (Sawada et al., 1995). 35S amplifizierte einen Teil des CaMV 35S Promotors des Vektors pHANNIBAL (Wesley et al., 2001) zur Kontrolle auf den Einbau der pHANNIBAL-Transformationskassette aus pART27, *nptII* (Korrespondenz mit A. Gleave, Karavangeli et al., 2005) diente zur Kontrolle auf die Anwesenheit einer leeren Transformationskassette des Vektors pART 27 und *rolA*, *rolB*, *rolC* (Geisler, 2001) zeigten an, ob die ausgewählten Wurzeln tatsächlich durch Agrobakterieneinfluss entstanden und keine Adventivwurzeln waren. Dies war vor allem bei den Kontroll-Hairy Roots von Interesse, die ohne pART27 transformiert wurden, da bei ihnen kein Selektionsmarker verwendet werden konnte.

Primerkombinationen und ihre Annealingtemperaturen und die Größe der PCR-Produkte:

35 for/35 rev:	55 °C	674 bp
nptII for/nptII rev:	65 °C	699 bp
rolA for/rolA rev:		302 bp
rolB for/rolB rev:		779 bp
rolC for/rolC rev:		539 bp
Triplex-PCR mit allen rol-Primern:	60 °C	
virC	55 °C	730 bp

Primersequenzen für Kontroll-PCRs:

35 for: 5' – TCG ACG AAT TAA TTC CAA TCC
 35 rev: 5' – GAT GCA ATT AGT CCT GAA TC
 nptII for: 5' – AGG CTA TTC GGC TAT GAC TG
 nptII rev: 5' – ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA
 rolA for : 5' – CCG GAC TAA ACG TCG CCG GC
 rolA rev : 5' – GAA CGT CCC GGT CGG GCT TG
 rolB for: 5' – TCT CAC TCC AGC ATG GAG CC
 rolB rev: 5' – GAG AGT CGC AGG GTT AGG TC
 rolC for: 5' – ATG CCT CAC CAA CTC ACC AG
 rolC rev : 5' – GAC AAG CAG CGA TGA GCT AG
 virC for: 5' – ATC ATT TGT AGC GAC T
 virC rev: 5' – AGC TCA AAC CTG CTT C

Es wurden Standard-PCR-Reaktionen mit GoTaq-Polymerase durchgeführt (siehe 2.1.2.).

2.3.3. RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial wurde die „single step“-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) angewendet.

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Von dem gemörserten Material wurden etwa 50 mg in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Zum gefrorenen Material wurden 500 µl Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat; 25 mM Na-Citrat, pH 7,0; 0,5% (w/v) Laurylsarcosin) gegeben. Das Ganze wurde für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und immer wieder gemischt. Dann wurden 50 µl 2 M Na-Acetat, pH 4; 500 µl mit Citrat-Puffer gesättigtes Phenol und 100 µl eiskaltes Chloroform zugegeben. Die Lösungen wurden gut vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C getrennt. 400 µl von der oberen, wässrigen Phase wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene RNA wurde mit einem Volumen (400 µl) eiskaltem Isopropanol versetzt und 15 Minuten bei -20 °C gefällt. Die RNA wird durch 10 Minuten Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde erst mit 70% Ethanol und dann mit 98% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für fünf Minuten bei 37 °C getrocknet. Danach konnte das Pellet in 20 µl sterilem Wasser bei 50 °C gelöst werden. Zur Qualitäts- und Quantitätsbestimmung wurden eine UV-spektrometrische Konzentrationsbestimmung und eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

2.3.4. cDNA-Synthese

Zum Umschreiben der RNA zu cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet.

Die verwendete Menge RNA zum Umschreiben richtete sich nach der Probe mit der geringsten Konzentration, von der das Maximalvolumen von 11 µl nach Herstellerangaben verwendet wurde.

Zu der RNA wurde 1 µl Oligo-dT (0,5 mg/ml) pipettiert und das Volumen auf 12 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, um ein Annealing des Oligo-dT-Primers an den Poly-A-Schwanz der RNA zu erreichen. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und dann 4 µl Puffer, 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20 u/µl) und 2 µl dNTPs (10 mM) zugegeben. Darauf folgte eine Inkubation von fünf Minuten bei 37 °C. Der Ansatz wurde erneut kurz auf Eis abgekühlt und

dann 1 µl Reverse Transkriptase (200 u/µl) zugesetzt. Das Umschreiben der RNA zu cDNA fand bei 42 °C für eine Stunde statt. Die Reverse Transkriptase wurde durch das Erhitzen für 10 Minuten auf 70 °C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C. 3 µl dieser cDNA wurden direkt für einen PCR-Ansatz von 25 µl eingesetzt.

2.3.5. Semiquantitative PCR auf cDNA

Zur indirekten Bestimmung des mRNA-Gehalts der HPPR, der RAS und der HPR in den verschiedenen Linien der Hairy Roots wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Dazu wurden die Gesamtlängen der drei Gene zusammen mit einem Aktin-Genfragment (Al-Qsous et al., 2004) als internem Standard amplifiziert. Es wurde jeweils eine Duplex-PCR durchgeführt mit den Kombinationen HPPR/Aktin, RAS/Aktin und HPR/Aktin.

Primerkombinationen und ihre Annealingtemperaturen, sowie die Größe der PCR-Produkte:

HPPR/Aktin:	60 °C	942 + 150 bp
RAS/Aktin:	50 °C	1293 + 150 bp
HPR/Aktin:	60 °C	1161 + 150 bp

Primersequenzen:

Aktin for:	5' – CTT ATG TTG CCC TGG ACT ATG AGC
Aktin rev:	5' – GGC AAC GGA ATC TCT CAG CTC C
HPPR <i>Xho</i> I for:	5' – TAT GAA TTC ATG AAG ATA GAA GTC AAA G
HPPR <i>Bam</i> HI rev:	5' – GAT GGA TCC TCA AAT CTC ATA AAA CAA C
RAS <i>Eco</i> RI for:	5' – ATA CTC GAG ATG GAG GCG ATT GGC
RAS <i>Bam</i> HI rev:	5' – TAT GGA TCC TCA AAC TAC TGG AGT TAA GAG
HPR <i>Nde</i> I f:	5' – ATT ACA TAT GGC GAA ACC GTT GCA AGT TG
HPR <i>Bam</i> HI r:	5' – TAG GAT CCT CAT CAT AGC TTT GAG ACT GGC AAG C

Die PCR wurde mit GoTaq-Polymerase wie folgt durchgeführt:

3,0	µl	Template
5,0	µl	5x Puffer
2,5	µl	MgCl ₂ 25 mM
0,5	µl	forward Primer 10 pmol/µl
0,5	µl	reverse Primer 10 pmol/µl
0,5	µl	dNTPs 10 mM
0,1	µl	GoTaq-Polymerase 5 u/µl
13,0	µl	steriles Wasser
25,0	µl	Gesamtansatz

95 °C	1 min	} x 28 Zyklen
95 °C	45 s	
X °C	45 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	5 min	
4 °C	Pause	

Wegen der geringen Größe des Aktin-Produktes wurde ein 2 %iges Agarose-Gel verwendet. Es wurden die gesamten 25 µl PCR-Ansatz auf das Agarose-Gel gegeben, um den Fehler für die semiquantitative Bestimmung der Produktmenge zu verringern.

2.4. Southern Blot

Der Southern Blot ist eine Methode, die 1975 von Edwin Southern entwickelt wurde (Southern, 1975). Sie ermöglicht den Nachweis bestimmter bekannter Gensequenzen aus einem Gemisch gesamtgenomischer DNA. Bei dieser Methode wird genomische DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut und die dabei entstehenden unterschiedlich großen Stücke über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Durch eine alkalische Lösung (meist Natronlauge) werden die DNA-Doppelstränge denaturiert und können dann auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon übertragen werden (Blotten). Die DNA auf der Membran kann nach Fixierung mit einer ebenfalls einzelsträngigen DNA- oder RNA-Sequenz (Sonde) gepaart werden (Hybridisierung). Durch eine Markierung der Sonde mit Radioaktivität oder durch chemische Gruppen kann die Sonde direkt mit Röntgenfilm oder indirekt, meist über Antikörper, nachgewiesen werden.

Ein Southern Blot wurde im Zuge dieser Arbeit durchgeführt, um die Anzahl der ins Pflanzengenom integrierten Konstrukte aus pART27 zu ermitteln. Dafür war eine reinere DNA nötig als für die PCR, und es wurde deshalb auf eine andere Isolationsmethode zurückgegriffen, die jedoch ebenfalls auf CTAB basiert (Rogers und Bendich, 1985).

2.4.1. DNA-Extraktion für Southern Blot

Zur Gewinnung von DNA wurden 300 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial in ein 2 ml-Reaktionsgefäß eingewogen. Darauf wurden 300 µl 2xCTAB-Puffer (2% (w/v) CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 M NaCl, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon MW 40.000) gegeben, der zuvor auf 65 °C erwärmt worden war. Der Ansatz wurde unter gelegentlichem Mischen bei 65 °C für 15 Minuten inkubiert und

anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Durch die Zugabe von 300 µl Chloroform, gutes Mischen und anschließende Zentrifugation von 5 Minuten bei 15.800 g wurden die Proteine aus der Lösung gefällt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem sich bereits 30 µl auf 65 °C erwärmter 10x CTAB-Puffer (10% (w/v) CTAB; 0,7 M NaCl) befanden. Erneut wurden 300 µl Chloroform zugegeben, gemischt und für 5 Minuten bei 15.800 g zentrifugiert. Mit diesem Schritt wurden eventuell noch vorhandene Proteine entfernt. 250 µl der oberen, wässrigen Phase wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 250 µl CTAB-Präzipitationspuffer (1% (w/v) CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0) zugegeben. Das Ganze wurde gut gemischt und für 10 Minuten bei 15.800 g zentrifugiert. Dabei pelletierte die DNA, und der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das lose DNA-Pellet wurde in 200 µl High Salt TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl) rückgelöst. Eine Zugabe von 400 µl Ethanol fällte die DNA bei -20 °C für 15 Minuten. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 15.800 g für 15 Minuten pelletiert. Dieses Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 Minuten bei 37 °C getrocknet und anschließend in 30 µl 0,1xTE mit RNase A (100 µg/ml) bei 50 °C für 10 Minuten rückgelöst und vorhandene RNA verdaut. Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch ermittelt.

2.4.2. Restriktionsverdau der genomischen DNA

Ein Restriktionsverdau für den Southern Blot setzte sich folgendermaßen zusammen:

x	µl	DNA (30-35 µg)
10	µl	10x Puffer für <i>EcoRI</i>
10	µl	<i>EcoRI</i> (10 u/µl)
ad 100	µl	steriles Wasser
100	µl	Gesamtansatz

Dieser Ansatz wurde für mindestens 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurde nochmals 1 µl *EcoRI* zugesetzt und für weitere 1-2 Stunden verdaut.

2.4.3. Fällung der verdauten genomischen DNA

Da das Volumen des Restriktionsverdauansatzes für den Southern Blot zu groß war, um auf ein Agarose-Gel aufgetragen zu werden, wurde die DNA anschließend gefällt und in einem kleineren Volumen rückgelöst. Dafür wurden zu dem Verdau 10 µl 3 M Natriumacetat und 100 µl Isopropanol pipettiert. Der Ansatz wurde gut gemischt und die DNA bei -20 °C für 15 Minuten gefällt. Die gefällte DNA wurde für 15 Minuten bei 15.800 g pelletiert. Das Pellet

wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei 37 °C getrocknet und in 25 µl 1xTE-Puffer bei 50 °C für 10 Minuten rückgelöst.

2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese und Blotten der DNA auf eine Nylonmembran

Die für den Southern Blot verdaut DNA wurde auf ein 0,6%iges Agarose-Gel geladen. Nach etwa zwei Stunden Elektrophorese bei 100 V wurde das Gel dokumentiert. Die DNA auf dem Gel wurde durch eine Inkubation des Gels von 20 Minuten in Depurinierungspuffer (0,25 M HCl) fragmentiert, um so einen besseren Transfer von großen DNA-Stücken (> 10 kb) auf die Membran zu gewährleisten. Daran schlossen sich zwei Waschungen von jeweils 20 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) an. Anschließend wurde zur Entfernung der Lauge das Gel zweimal für je 20 Minuten in Neutralisationspuffer gewaschen (0,1 M Tris-HCl pH 7,0; 1,5 M NaCl).

Beim Blotten wird DNA vom Gel auf eine Membran transferiert. Dies kann durch Kapillarkräfte, Vakuum oder durch elektrische Ladung geschehen. In diesem Fall wurde der Transfer durch Kapillarkräfte durchgeführt. Es wurde mit 10x SSC-Puffer (1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat; pH 7,0) geblottet. Für den Aufbau des Blots wurde ein Gefäß mit 10x SSC-Puffer befüllt, welches als Reservoir dient. In dieses Reservoir wurde eine erhöhte Brücke gestellt, bestehend aus einem umgedrehten Plastikbehälter über den ein Filterpapier gelegt wird, welches bis in den Puffer reicht. Dieses Filterpapier kann die Flüssigkeit aus dem Reservoir aufnehmen und weiterleiten. Direkt auf die Filterpapierbrücke wurde das Agarose-Gel mit der Oberseite Richtung Filterpapier platziert. Um zu gewährleisten, dass die Kapillarkräfte nur über das Gel zum Tragen kamen, wurde rund um das Gel auf die Filterpapierbrücke Parafilm gelegt. Auf das Gel wurde passgenau ein Stück Nylonmembran (Roche) gelegt. Auf die Membran kamen, ebenfalls passgenau, je zwei feuchte und zwei trockene Stücke Filterpapier. Auf das Filterpapier wurde anschließend ein Stapel Papiertücher gelegt. Um einen sauberen Transfer zu gewährleisten, musste darauf geachtet werden, dass sich in diesem System keine Luftblasen befanden. Zusätzlich wurde der Papierstapel durch ein Gewicht von etwa 0,5 kg beschwert. Der Papiertücherstapel saugt den 10x SSC-Puffer über die Filterpapierbrücke durch das Gel hindurch und überträgt dabei die DNA auf die Nylonmembran. Dieser Vorgang fand über Nacht statt.

Am nächsten Tag wurde die Blotaufbau abgebaut. Die Membran wurde zusammen mit dem Gel von der Filterpapierbrücke genommen, mit der Membranseite nach unten auf ein trockenes Filterpapier gelegt und die Lage der Taschen des Gels mit Bleistift auf der Membran markiert. Das Gel wurde anschließend verworfen und die Membran zwischen zwei Filterpapierstücken etwa ein bis zwei Stunden getrocknet. Die Membran wurde mit dem UV-

Stratalinker behandelt. Dabei wurde die DNA durch UV-Licht kovalent auf der trockenen Membran fixiert. Nun konnte die Membran für die Hybridisierung verwendet werden.

2.4.5. Synthese von Digoxigenin-markierten Sonden über PCR

Die Sonden für die Hybridisierung wurden mit dem PCR DIG-Probe Synthesis Kit der Firma Roche nach Anleitung hergestellt.

0,5	µl	Template
5,0	µl	10x Puffer + MgCl ₂
5,0	µl	dNTP-Mix mit DIG-Markierung
1,0	µl	forward Primer
1,0	µl	reverse Primer
0,75	µl	Taq-Mix
36,0	µl	steriles Wasser
25,0	µl	Gesamtansatz

Es wurde eine nptII-Sonde und eine 35S-Sonde hergestellt. Dabei wurden dieselben Primer und PCR-Programme verwendet wie unter 2.3.2.. Die Sonden wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die Größe zu überprüfen und eventuell vorhandene PCR-Artefakte, Template und Primer zu beseitigen. Die Sonden-Banden wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin-Kits von Macherey-Nagel (siehe 4.1.4.) aufgereinigt und in 30 µl sterilem Wasser eluiert.

2.4.6. Hybridisierung der Membran mit der Digoxigenin-markierten Sonde

Hybridisierung und Detektion wurden nach dem optimierten Protokoll von Engler-Blum für nicht-radioaktive Southern Blots durchgeführt (Engler-Blum et al., 1993). Zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran mit der fixierten DNA bei 68 °C unter leichtem Schütteln in Prähybridisierungspuffer (0,25 M Na₂HPO₄, pH 7,2; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20% SDS; 0,5% Blocking-Reagenz) für eine Stunde inkubiert. Dies dient der Reduzierung des Hintergrundes durch unspezifisch an die Membran gebundene Sonde. Für die Hybridisierung wurde die Sonde für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. 10 µl dieser Sonden-Lösung wurden zu 50 ml frischem, 68 °C warmem Prähybridisierungspuffer gegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 68 °C unter leichtem Schütteln in diesem Hybridisierungspuffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 20 Minuten bei 65 °C in etwa 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer (20 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1% SDS) unter leichtem Schütteln gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde von der DNA zu entfernen. Anschließend erfolgte die Detektion der mit Digoxigenin markierten

Sonde mittels an Alkalische Phosphatase gekoppeltem Antikörper und Chemolumineszenz-Reagenz, dessen Signal mit einem Röntgenfilm detektiert wurde.

2.4.7. Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde

Sämtliche Schritte der Detektion (Engler-Blum et al., 1993) wurden, soweit nicht speziell erwähnt, bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln durchgeführt und jeweils ein Volumen von etwa 50 ml Puffer verwendet.

Für die Detektion wurde die Membran für 5 Minuten in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 3 M NaCl; 0,3% Tween 20; pH 8,0) äquilibriert. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde in Blocking-Puffer (Waschpuffer; 0,5% Blocking-Reagenz) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in Antikörper-Lösung (Blocking-Puffer; 1:10.000 Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer für jeweils 10 Minuten entfernt. Danach wurde die Membran für 5 Minuten in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂; pH 9,5) äquilibriert. Als letztes wurde die Membran für zwei Minuten in 10 ml Substrat-Puffer (Detektionspuffer; 1:100 CSPD) inkubiert. Anschließend ließ man die Membran gut abtropfen und schlug sie blasen- und knitterfrei in Saran-Folie ein. Auf die Vorder- und Rückseite der Membran wurde in einer Dunkelkammer ein Film gelegt und bei 37 °C in einer Röntgenkassette exponiert. Der erste Film konnte nach etwa 3-4 Stunden entwickelt werden. Zum Entwickeln wurden Entwickler (GBX developer and replenisher) und Fixierer (GBX fixer and replenisher) von Kodak verwendet. Der Film wurde etwa 1-2 Minuten in Entwicklerlösung geschwenkt, kurz in destilliertem Wasser gespült und etwa eine Minute in Fixierer geschwenkt. Zuletzt wurde der Film gut mit destilliertem Wasser abgespült und zum Trocknen aufgehängt. Je nach Intensität des Signals wurde der zweite Film weiter exponiert, um eventuell ein stärkeres Signal zu erhalten.

2.5. Charakterisierung der transgenen Hairy Roots

Tag 12 als Erntezeitpunkt durch Zeitreihe festgelegt für Messungen von Enzymtests und Rosmarinsäuregehalt.

Tag 12 wurde als Erntezeitpunkt durch eine Zeitreihe ermittelt und zu diesem Zeitpunkt Enzymtests und die Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde am 12. Kulturtag geerntet, mit Zellstoff weitgehend von

Flüssigmedium befreit, gewogen und anschließend bei -80 °C eingefroren. Zur Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und portionsweise abgefüllt. Für die Extraktion der Rosmarinsäure wurden mindestens 0,5 g, vorzugsweise 1 g gemörsertes Material in Analysenröhrchen mit Deckel eingewogen und kurzfristig (maximal 24 Stunden) bei -20 °C gelagert. Für Proteinrohextrakte wurden zwei 2 ml-Reaktionsgefäße mit jeweils 0,5 g Pflanzenmaterial befüllt und bei -80 °C gelagert.

2.5.1. Proteinrohextrakt aus Pflanzenmaterial

Zu den gefrorenen Proben in den 2 ml-Reaktionsgefäßen werden 0,2 g/g Pflanzenmaterial Polyclar 10 (also 0,1 g) und 1 ml/g Pflanzenmaterial (also 0,5 ml) Phosphatpuffer (0,1 M KPi, pH 7,0 mit 0,1 M DTT) gegeben. Während die Proben langsam auf Eis auftauten, wurden sie mit einem kleinen Pistill so gut wie möglich homogenisiert. Der Pflanzenbrei wurde für 15 Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine, er wurde in Portionen von 150 µl abgefüllt. Der Proteinrohextrakt wurde bei -20 °C gelagert.

2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford-Reagenz (Bradford, 1976) findet im Photometer statt. Der dabei verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 bildet in saurer Lösung Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm in seiner rötlichen ungebundenen Form zu 595 nm in seiner gebundenen bläulichen Form. Die Intensität des Farbumschlages und damit die Extinktion hängen proportional von der Proteinkonzentration ab. Die Proteinkonzentration einer Lösung kann daher mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm anhand einer Kalibrierung mit bekannten Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

Zur Durchführung der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 2 ml Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie Brilliant Blau G 250; 50 ml 96% Ethanol; 100 ml 85% Phosphorsäure; ad 1000 ml destilliertes Wasser; zweimal filtriert) in Makroküvetten pipettiert. Eine Küvette diente als Referenz und wurde mit 20 µl entsprechendem Puffer versehen. Für die Proteinbestimmung wurden Parallelproben erstellt und der Küvetteninhalt mit 20 µl Proteinlösung durch Umdrehen vermischt. Die Proben wurden in Abständen von 30 Sekunden angesetzt und das Bradford-Protein-Gemisch für mindestens 15 Minuten inkubiert. Die Messungen fanden im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm, ebenfalls in 30 Sekunden-Abständen, statt. Zur Standardisierung wurde eine Doppelprobe mit je 20 µl BSA-Lösung von der Konzentration 1 mg/ml vermessen. Die unbekannten

Konzentrationen wurden anhand der Extinktion der bekannten Konzentration des BSA-Standards berechnet.

2.5.3. Enzymtests: allgemeine Angaben

In dieser Arbeit wurden Enzymtests zur Quantifizierung der jeweiligen Enzymaktivität durchgeführt. Die verwendeten Substrate wurden deshalb im Überschuss eingesetzt, so dass nur die Enzymmenge Einfluss auf die spezifische Aktivität hatte. Es wurde sichergestellt, dass die Messungen im linearen Bereich einer Proteinkonzentrationskurve stattfanden.

Zum Ansetzen der Enzymtests wurde auf Eis gearbeitet.

Da alle Produkte der in dieser Arbeit verwendeten Enzymtests lipophil genug waren, um den Übergang in eine organische Phase zu ermöglichen, wurden die Enzymtests mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Das heißt, der gestoppte Enzymtest wurde mit 500 µl Ethylacetat versehen. Dieser Ansatz wurde für 10 Sekunden heftig gemischt, anschließend 5 Minuten bei 15.800 g zentrifugiert und die obere Ethylacetatphase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Ethylacetatphasen vereinigt. Das Ethylacetat wurde bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand in 50 µl des entsprechenden Fließmittels rückgelöst und mittels HPLC vermessen.

2.5.4. TAT-Enzymtest

Der Enzymtest enthielt folgende Komponenten:

160	µl	1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 *
10	µl	2 mM Pyridoxalphosphat (in H ₂ O)
20	µl	400 mM 2-Oxoglutarat (in H ₂ O)
10	µl	150 mM L-Tyrosin (in 0,5 N HCl)
50	µl	Proteinrohextrakt
250	µl	Gesamtansatz

Die Reaktion wurde mit Proteinrohenzym gestartet. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 30 °C inkubiert und mit 100 µl 6 N HCl gestoppt.

* 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0: (121,14 g/l Tris; mit HCl auf pH 9,0 einstellen)

2.5.5. PAL-Enzymtest

Der Enzymtest enthielt folgende Komponenten:

150	µl	Borsäure-Borax-Puffer, pH 8,8*
40	µl	0,1 M L-Phenylalanin (in H ₂ O)
20	µl	Proteinrohextrakt
200	µl	Gesamtansatz

Die Reaktion wurde mit Proteinrohextrakt gestartet. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 36 °C inkubiert und mit 20 µl 6 N HCl gestoppt.

* Borsäure-Borax-Puffer, pH 8,8 (60,7 ml 0,05 M Borax; 39,3 ml 0,2 M Borsäure)

2.5.6. HPPR-Enzymtest

Der Enzymtest enthielt folgende Komponenten:

100	µl	0,1 M KPi-Puffer, pH 7,0 *
10	µl	1 mM Ascorbat (in H ₂ O)
10	µl	0,1 M Dithiothreitol (in H ₂ O)
10	µl	50 mM NADPH (in H ₂ O)
20	µl	25 mM pHPP (in 20% Ethanol)
100	µl	Proteinrohextrakt
250	µl	Gesamtansatz

Die Reaktion wurde mit Proteinrohextrakt gestartet. Der Ansatz wurde für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert und mit 25 µl 6 N HCl gestoppt.

*0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0: (10,712 g/l K₂HPO₄, 5,24 g/l KH₂PO₄)

2.5.7. RAS-Enzymtest

Der Enzymtest enthielt folgende Komponenten:

32,5	µl	0,1 M KPi-Puffer, pH 7,0
10,0	µl	12,5 mM Ascorbat (in H ₂ O)
12,5	µl	0,1 M Dithiothreitol (in H ₂ O)
5,0	µl	20 mM pHPL (20% Ethanol)
25,0	µl	2,5 mM Caffeoyl-CoA (in H ₂ O)
40,0	µl	Proteinrohextrakt
125	µl	Gesamtansatz

Die Reaktion wurde mit Proteinrohextrakt gestartet. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 30 °C inkubiert und mit 20 µl 6 N HCl gestoppt.

2.5.8. Synthese von Caffeoyl-CoA

Die Herstellung von Caffeoyl-CoA erfolgte im Grundprinzip nach der von Stöckigt und Zenk (1975) entwickelten Methode.

Zur Synthese von Caffeoyl-CoA wurden 25,2 mg NaHCO_3 in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und für 15 Minuten mit Stickstoff durchgast. Darin wurden 23 mg Coenzym A gelöst und die Lösung für weitere 15 Minuten mit Stickstoff durchgast. 56 mg Caffeoyl-Succinimid-Ester (hergestellt von Juliane Meinhard) wurden in 0,5 ml Aceton gelöst und langsam zu der durchgasenden CoA-Lösung gegeben. Dabei bildete sich ein Niederschlag, der durch die Zugabe von 6 ml Aceton wieder gelöst wurde, so dass man eine klare gelbe Lösung erhielt. Das Gefäß wurde verschlossen, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und bei 25 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Aceton entfernt, indem Stickstoff über die Lösung geleitet wurde. Die so erhaltene gelbe Lösung wurde in einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von etwa 200 µl eingeengt. Diese Lösung wurde zur Reinigung auf vier DC-Platten (Cellulose F auf Kunststoffträger von Merck) strichförmig aufgetragen und in einem Laufmittel aus Butanol:Essigsäure:Wasser in den Verhältnissen 5:2:3 über Nacht aufgetrennt. Die Caffeoyl-CoA-Bande wurde unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm markiert (siehe Abb. 2.6.) und mit einem Spatel ausgekratzt und in zwei 2 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Das Cellulosepulver wurde einmal mit 500 µl destilliertem Wasser und dreimal mit 200 µl destilliertem Wasser durch kräftiges Mischen extrahiert. Es wurde jeweils für 5 Minuten bei 15.800 g zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Diese wässrige Caffeoyl-CoA-Lösung wurde erneut in einer Vakuumzentrifuge auf etwa 300 µl eingeengt. Zur Bestimmung der Konzentration der Lösung wurde im UV-VIS-Spektrometer ein Wellenlängen-Scan von 200-500 nm in Quarzküvetten aufgenommen, als Referenz diente destilliertes Wasser. Anhand der Extinktion im Absorptionsmaximum bei 346 nm, des Extinktionskoeffizienten von Caffeoyl-CoA und unter Berücksichtigung der Verdünnung für die Messung kann die Konzentration der Caffeoyl-CoA-Lösung mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden.

$$C = \frac{V_{\text{Küvette}} \cdot E_{346\text{nm}}}{V_{\text{Caffeoyl-CoA}} \cdot \epsilon_{346\text{nm}} \cdot d}$$

$V_{\text{Küvette}}$ ist das Gesamtvolumen in der Küvette (= 502 µl)

E ist die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 346 nm

$V_{\text{Caffeoyl-CoA}}$ ist das eingesetzte Volumen der Caffeoyl-CoA-Lösung (= 2 µl)

ϵ_{346} ist der Extinktionskoeffizient von Caffeoyl-CoA bei 346 nm (= 18 L • mol⁻¹ • cm⁻¹)

d ist die Schichtdicke der Küvette (= 1 cm)

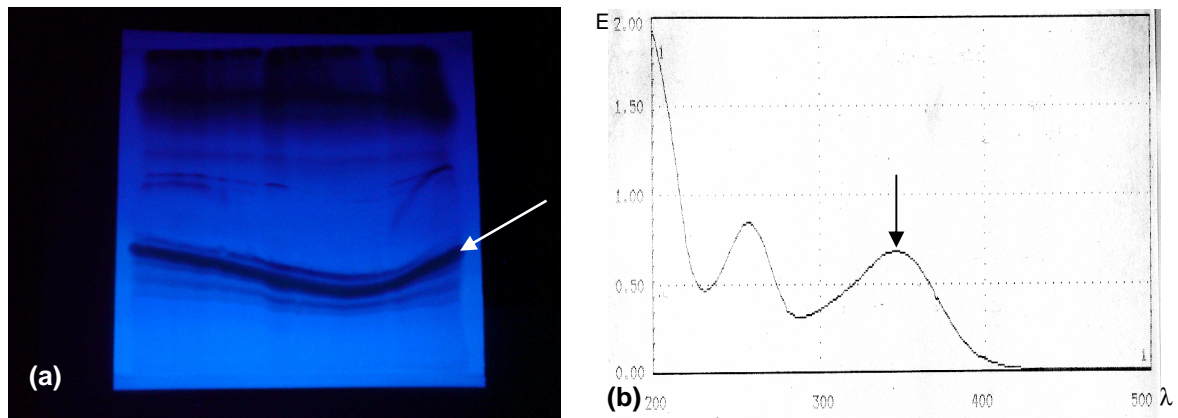


Abb. 2.6.: (a) Bild der DC nach dem Lauf unter UV, der Pfeil markiert die Caffeoyl-CoA-Bande; (b) UV/VIS-Spektrum des Caffeoyl-CoA von 200 bis 500 nm Wellenlänge, der Pfeil zeigt auf das Extinktionsmaximum bei 346 nm.

2.5.9. Extraktion von Rosmarinsäure

Das in den Analysenröhrchen abgefüllte, gefrorene Pflanzenmaterial wurde für mindestens 24-48 Stunden gefriergetrocknet. Von dem gefriergetrockneten Material wurden 20 mg in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingewogen. Das Pulver wurde mit 1 ml 70% Ethanol gut vermischt und für zweimal 10 Minuten bei 70 °C im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 15.800 g zentrifugiert, um die groben Bestandteile aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand wurde für die HPLC-Analyse 1:10 mit Laufmittel (Methanol-H₂O 45:55; 0,01% H₃PO₄ 85%) verdünnt. Rosmarinsäure wurde bei einer Wellenlänge von 333 nm detektiert.

2.5.10. Zusammenfassung der HPLC-Bedingungen

Alle HPLC-Analysen wurden mit einer Equisil-Säule (250 mm x 4 mm) mit einer passenden Vorsäule (20 mm x 4 mm) durchgeführt.

Enzymtest/Naturstoffe	Detektiertes Produkt	Fluss	Laufmittel (MeOH:H ₂ O; 0,01 % H ₃ PO ₄ (85%))	λ [nm]
Rosmarinsäure	RA	1 ml/min	45:55	333
TAT	pHPP	1 ml/min	32:68	283
PAL	CA	1 ml/min	30:70	290
HPPR	pHPL	1 ml/min	30:70	280
RAS	CaffpHPL	1 ml/min	42:58	333

RA = Rosmarinsäure, pHPP = 4-Hydroxyphenylpyruvat, CA = *t*-Zimtsäure, pHPL = 4-Hydroxyphenyllaktat, Caf-pHPL = Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllaktat.

2.6. Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der rekombinanten Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) aus *Arabidopsis thaliana*

2.6.1. Expression des Proteins in *E. coli*

Das offene Leseraster der Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) aus *Arabidopsis thaliana* wurde von Verena Janiak in den pET15b-Vektor ligiert und in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS eingebracht. Für die folgenden Experimente wurde der HPR Arabi 7c-Klon verwendet. Zur Expression wurde erst eine Übernachtskultur angeimpft. Mit 1 ml Übernachtskultur wurden 100 ml frisches LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und 220 UpM inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 1 ml 0,1 M IPTG. Die Kultur wurde weitere 5 Stunden bei 37 °C und 220 UpM geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 5000 g für 5 Minuten in 50 ml-Greiner-Röhrchen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Gewicht des Bakterienpellets bestimmt und das Pellet bei -80 °C eingefroren.

2.6.2. Aufschluss der Bakterien

Das Bakterienpellet wurde langsam auf Eis aufgetaut und die Bakterien mit 5 ml Bindepuffer (0,05 M KPi-Puffer, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) pro g Bakterien resuspendiert. Verwendet wurden Pellets von etwa 1,5 g. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch Ultraschall für viermal 30 Sekunden bei 0,6 Cyclen und 100% Intensität. Die unerwünschten Bakterienbruchteile wurden durch eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 10.000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand mit dem Proteinrohextrakt wurde in ein frisches Gefäß überführt.

2.6.3. Aufreinigung des Proteins über His-Tag und Metallchelate-Chromatografie

Die Aufreinigung erfolgte über His-Tag-Säulen. Diese Methode beruht auf einer Affinitätschromatografie.

Das rekombinante Protein trägt durch eine entsprechende Sequenz auf dem verwendeten pET15b-Vektor am N-Terminus einen sogenannten His-Tag bestehend aus sechs Histidin-Resten. Diese Histidin-Reste können mit Nickel Komplexe bilden und lassen sich deshalb an ein Trägermaterial binden, welches Nickel enthält. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch einen Waschschriff von der Säule entfernt. Zur Elution wird eine hohe Imidazolkonzentration im Puffer eingesetzt, welche das His-Tag-tragende Protein vom Säulenmaterial verdrängt.

Zur Vorbereitung wurde die Säule, die 1 ml His-Select® HF Nickel Affinity Gel von Sigma-Aldrich enthielt, einmal mit Bindepuffer gespült. Der Proteinrohextrakt wurde anschließend auf die Säule gegeben und mit dem Säulenmaterial vermischt. Zur Bindung des Proteins mit His-Tag an das Säulenmaterial wurde die Säule für eine Stunde auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Säule wurde daraufhin zweimal mit jeweils 4 ml Waschpuffer (0,05 M KPi-Puffer, pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol) gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Die Elution des Proteins erfolgte mit dreimal 1 ml Elutionspuffer (0,05 M KPi-Puffer, pH 8,0; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol), die in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt wurden. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend umgepuffert. Um das Säulenmaterial zu regenerieren wurde zweimal mit Elutionspuffer und einmal mit Bindepuffer gespült. Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurde das Säulenmaterial in Bindepuffer bei 4 °C gelagert.

2.6.4. Dialyse zur Umpufferung der Proteinlösung nach der Aufreinigung

Um das Imidazol des Elutionspuffers aus dem aufgereinigten Proteinextrakt zu entfernen, wurde ein Pufferaustausch durch Dialyse durchgeführt.

Der für die Dialyse verwendete Dialysierschlauch (ZelluTrans 25 mm; Größenausschluss: 12.000-14.000 Da, Roth) wurde für 15 Minuten in destilliertem Wasser eingeweicht und dann mit dem aufgereinigten Proteinextrakt befüllt. Der befüllte Dialysierschlauch wurde in mindestens 1 l 0,1 M KPi, pH 7,0 gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der umgepufferte Proteinextrakt wurde am nächsten Tag portionsweise in 1,5 ml-Reaktionsgefäße gefüllt und bei -20 °C gelagert. Zur Messung wurde die Enzymlösung meistens 1:100 verdünnt auf eine Proteinkonzentration von etwa 0,01 mg/ml. Da bei so geringer Konzentration die Stabilität des Proteins nicht mehr gewährleistet war, wurden dem

verdünnten Proteinextrakt 1 mg/ml BSA zugesetzt. Dies reichte aus, um die Stabilität des Proteins auf Eis für etwa 10 Stunden zu bewahren.

2.6.5. HPR-Enzymtest

Der HPR-Enzymtest wurde am UV/VIS-Spektrometer gemessen. Dabei wurde die Absorptionsabnahme durch den Umsatz von NADH oder NADPH bei einer Wellenlänge von 380 nm beobachtet. Die Messzellen des Photometers konnten durch den Anschluss an ein Wasserbad auf 37 °C temperiert werden. Die Küvetten wurden mit dem Reaktionsgemisch ohne Hydroxypyruvat 2 Minuten im Photometer vorgewärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Hydroxypyruvat gestartet. Es wurde über einen Zeitraum von 4 Minuten gemessen

Standardtestansatz:

50 µl	NADPH	6,25 mM
50 µl	Hydroxypyruvat	25 mM
20 µl	Enzym	0,01 mg/ml
380 µl	KPi-Puffer	0,1 M, pH 7,0
500 µl	Gesamtvolumen	

Die Ansätze wurden je nach zu bestimmendem K_m -Wert variiert und die Volumina angeglichen.

K_m von	Volumen und Konzentrationen		mit	Enzym (mg/ml)
NADPH	1 µl-70 µl	6,25 mM	50 µl Hydroxypyruvat 25 mM	0,01-0,02
Hydroxypyruvat	5 µl-60 µl	12,5 mM	50 µl NADPH 6,25 mM	0,01-0,02
Pyruvat	5 µl-70 µl	500 mM	50 µl NADPH 6,25 mM	0,5-0,7
NADPH	2,5 µl-80 µl	1,56 mM	40 µl Pyruvat 1 M	0,3
NADH	2,5 µl-60 µl	25 mM	50 µl Hydroxypyruvat 25 mM	0,01-0,02
Hydroxypyruvat	5 µl-80 µl	25 mM	40 µl NADH 25 mM	0,01-0,02
NADH	2,5 µl-50 µl	20 mM	40 µl Pyruvat 1 M	1-1,5
Pyruvat	5 µl-80 µl	500 mM	50 µl NADH 20 mM	0,5
Glyoxylat	5 µl-80 µl	50 mM	50 µl NADPH 25 mM	0,04

Bestimmung des Temperaturoptimums:

50 µl	NADPH	1,56 mM	70 µl	NADPH	6,25 mM
60 µl	Pyruvat	0,5 M	60 µl	Hydroxypyruvat	12,5 mM
20 µl	Enzym	0,6 mg/ml	20 µl	Enzym	0,02 mg/ml
370 µl	KPi-Puffer	0,1 M, pH 7,0	350 µl	KPi-Puffer	0,1 M, pH 7,0
500 µl	Gesamtvolumen		500 µl	Gesamtvolumen	

Bestimmung des pH-Optimums:

50 µl	NADPH	1,56 mM
60 µl	Pyruvat	0,5 M
20 µl	Enzym	0,6 mg/ml
370 µl	KPi-Puffer	0,1 M, pH 2,3-12
500 µl	Gesamtvolumen	

70 µl	NADPH	6,25 mM
60 µl	Hydroxypyruvat	12,5 mM
20 µl	Enzym	0,02 mg/ml
350 µl	KPi-Puffer	0,1 M, pH 2,3-12
500 µl	Gesamtvolumen	

2.7. Medien

2.7.1. CB2OH

Das CB2OH-Medium wurde für die Kultivierung der sterilen *Coleus blumei*-Pflanzen und Hairy Roots als Festmedium verwendet. Für die Flüssigkulturen der Hairy Roots wurde das CB2OH-Medium flüssig verwendet.

Makroelemente (100x Stammlösungen → jeweils 10 ml/l Medium):

KNO ₃	250 g/l
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	25 g/l
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	17,2 g/l
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	15 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	13,4 g/l
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	2,56 g/l
mit NaEDTA • 2 H ₂ O	3,43 g/l

Mikroelemente (100x Stammlösung → 10 ml/l Medium):

H ₃ BO ₃	300 mg/l
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	300 mg/l
MnSO ₄ • H ₂ O	100 mg/l
KJ	75 mg/l
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	25 mg/l
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	25 mg/l
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	25 mg/l

Vitamine (1000x Stammlösung → 1ml/l Medium):

Thiamindichlorid	1000 mg/100 ml
Pyridoxin • HCl	100 mg/100 ml
Nicotinsäure	100 mg/100 ml

myo-Inosit 100 mg/l Medium

Saccharose 20 g/l Medium

NZ-Amine 2 g/l Medium

Gegenüber dem ursprünglichen CB2OH-Medium wurden hier standardmäßig die NZ-Amine weggelassen, da sie sich als nicht nötig erwiesen. Der pH-Wert wird auf 5,5 eingestellt und das Medium entsprechend abgefüllt (50 ml Medium in 100 ml-Kolben, 100 ml Medium in Gläsern für Pflanzenkulturen) und autoklaviert.

Für Festmedien wurde 1% Agar zugegeben.

2.7.2. YMB

Das YMB-Medium (Singleton, 2002) fand ausschließlich für die Agrobakterien als Flüssig- oder Festmedium Verwendung.

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,2 g/l
NaCl	0,1 g/l
Mannit	10 g/l
Hefeextrakt	0,5 g/l

pH 7,0 (mit HCl)

Für Festmedien wurde 1% Agar zugesetzt.

2.7.3. LB

LB-Medium (Bertani, 1951) diente zur Anzucht von *E. coli* als Fest- oder Flüssigmedium.

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

pH 7,0 (mit NaOH)

Für Festmedium wurde 1% Agar zugesetzt.

3. Materialien

3.1. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> :	DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe)
	JM109 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
	BL21(DE3)pLysS (Novagen, Bad Soden)

<i>Agrobacterium rhizogenes</i> *	LBA15834
	TR105
	LBA9402

*Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A.W. Alfermann, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

3.2. Pflanzenmaterial

Die aseptischen Pflanzenkulturen von *Coleus blumei* wurden von Maike Petersen aus Samen angezogen und existieren seit mindestens 20 Jahren. Eine Linie ging jeweils aus einem Samen hervor.

3.3. Primer

Alle verwendeten Oligonucleotidprimer wurden über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die trocken gelieferten Primer wurden nach Herstellerangaben in sterilem Wasser rückgelöst, um eine Konzentration von 10 pmol/ μ l zu erhalten. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Zur weiteren Verwendung in PCR-Ansätzen wurden diese Lösungen noch einmal 1:10 auf eine Konzentration von 1 pmol/ μ l verdünnt.

HPPR 1for:	5' – CAG GAT CCG AAC GCC GGT GCC	(EcoRI)	58 °C
HPPR 2rev:	5' – CGA AAG GGA ACC AGA GGT ACC GG	(Kpn I)	
HPPR 3for:	5' – CAG AAT TCG AAC GCC GGT GCC	(Bam HI)	58 °C
HPPR 4rev:	5' – CGA AAG GGA ACC AGA GAA GCT TCG C	(Hind III)	
RAS 1for:	5' – ATG AAT TCA TTT CCA CAT ACC CTC TC	(EcoRI)	55 °C
RAS 2rev:	5' – ATG GTA CCA TCG ATC GAC GAT CGC	(KpnI)	
RAS 3for:	5' – ATG GAT CCA TTT CCA CAT ACC CTC TC	(BamHI)	53 °C
RAS 4rev:	5' – TAT AAG CTT ATC GAT CGA CGA TCG C	(HindIII)	
HPPR XhoI for:	5' – TAT GAA TTC ATG AAG ATA GAA GTC AAA G	(XhoI)	56/60 °C
HPPR BamHI rev:	5' – GAT GGA TCC TCA AAT CTC ATA AAA CAA C	(BamHI)	
RAS EcoRI for:	5' – ATA CTC GAG ATG GAG GCG ATT GGC	(EcoRI)	59 °C
RAS BamHI rev:	5' – TAT GGA TCC TCA AAC TAC TGG AGT TAA GAG	(BamHI)	
35 for:	5' – TCG ACG AAT TAA TTC CAA TCC		55 °C
35 rev:	5' – GAT GCA ATT AGT CCT GAA TC		

nptII for:	5' - AGG CTA TTC GGC TAT GAC TG	65 °C
nptII rev:	5' - ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA	
rolA for :	5' - CCG GAC TAA ACG TCG CCG GC	60 °C
rolA rev :	5' - GAA CGT CCC GGT CGG GCT TG	
rolB for:	5' - TCT CAC TCC AGC ATG GAG CC	60 °C
rolB rev:	5' - GAG AGT CGC AGG GTT AGG TC	
rolC for:	5' - ATG CCT CAC CAA CTC ACC AG	60 °C
rolC rev :	5' - GAC AAG CAG CGA TGA GCT AG	
Aktin for:	5' - CTT ATG TTG CCC TGG ACT ATG AGC	50/60 °C
Aktin rev:	5' - GGC AAC GGA ATC TCT CAG CTC C	
virC for :	5' - ATC ATT TGT AGC GAC T	55 °C
virC rev :	5' - AGC TCA AAC CTG CTT C	

3.4. Chemikalien

Gängige, käufliche Chemikalien stammten von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) Sigma (Deisenhofen) in p.A.-Qualität.

Agar-Agar	C.E. Roeper GmbH, Hamburg
Agarose NEEQ Ultra Quality	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cefotaxim	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe
Coenzym A Trilithiumsalz	Applchem GmbH, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka, Buchs, Schweiz
CSPD-Lösung (25 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D-Glycerinsäure	Fluka, Steinheim
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
DL-p-Hydroxyphenyllactat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Fermentas, St. Leon-Roth
Ethidiumbromid, 1%ig	Applchem GmbH, Darmstadt
GeneRuler Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Roth
Glyoxylat	Fluka, Steinheim
Guanidinthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kodak GBX developer and replenisher	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kodak GBX fixer and replenisher	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kohrsolin	Bode Chemie, Hamburg
L-Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
L-Tyrosin	Fluka, Steinheim
Methanol	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Milchsäure	Roth, Karlsruhe
myo-Inositol	Roth, Karlsruhe
NAD	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg
NADH	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg
NADP	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg
NADPH	Roth, Karlsruhe
Nicotinsäure	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Phenol (Citratpuffer-gesättigt)	Sigma, Deisenhofen
p-Hydroxyphenylpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyclar 10	Sigma, Deisenhofen
Pyridoxin • HCl	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Pyruvat	Fluka, Steinheim

SDS-Pellets	Roth, Karlsruhe
Spectinomycin	AppliChem, Darmstadt
Streptomycin	Roth, Karlsruhe
Thiamindichlorid	Roth, Karlsruhe
Ticarcillin	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Zimtsäure	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
β -Hydroxypyruvat	Fluka, Steinheim

3.5. Geräte

Autoklav (groß)	Systec VX-150, Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wetztenberg
Autoklav (klein)	Advantage-Lab AL 02-02-100
Wasserreinigungsanlage	Milli RX20 Millipore, Schwalbach
Eismaschine	Scotsman AF100, Mailand, Italien
Photodokumentation für Agarosegele	Quickstore <i>plus</i> RS Systems
Gefriertrockner	Christ L1, B. Braun Biotech International, Melsungen
Vakuumpumpe	Vakuubrand, Wertheim
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Elektroden	Accumet Basic Fischer Scientific, Wohlen, Schweiz
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510H, Bandelin, Berlin
Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher UP 200S Hielscher Ultrasonics, Teltow
Schüttler für Pflanzenkulturen	Certomat® BS-1, B. Braun Biotech International, Melsungen HT (klein), Infors AG, Bottmingen, Schweiz HT (groß), Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Inkubationsschüttler	Gallenkamp, Loughborough, UK
Magnetrührer	MR3001 und MR1000, Heidolph, Kelheim
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg Biofuge 17RS Heraeus Sepatech, Osterode SIGMA 3K30 B. Braun Biotech., Melsungen Sorvall® RC 50 plus DuPont, Bad Homburg
HPLC	Kontron (ehemals Neufahrn): Pumpen: 422, Detektor 430A
Integration	PC Integrations Pack (Version 4.02, Dez. 1996)
Spektralphotometer	Uvikon 930 Spectrophotometer, Kontron, ehemals Neufahrn
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Waagen	Mettler H64, Mettler-Toledo GmbH, Giessen Kern EW, Kern & Sohn GmbH, Balingen PT310 Sartorius, Sartorius AG, Göttingen
UV-Detektion	Bachofer GmbH, Reutlingen
Sterile Werkbank	Class 100, Gelaire, Gelman Instrument Opera, Milano, Italien
Transilluminator	TFX -35, Vilber Lourmat, Frankreich

3.6. Vektoren

pHANNIBAL	
pART27	
pET15b	(Novagen, Bad Soden)

3.7. Kits für molekularbiologische Arbeiten

NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep® Spin	QIAGEN, Hilden
His-Select® HF Nickel Affinity Gel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roti® Transform	Roth, Karlsruhe
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
High-Fidelity DNA-Polymerase-Mix mit Puffern	Fermentas, St. Leon-Roth

3.8. Enzyme, Proteine

GoTaq-DNA-Polymerase mit Puffern (5 U/µl)	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase (5U/µl) mit Puffer	Fermentas, St. Leon-Roth
sämtliche Restriktionsenzyme mit Puffern (10 U/µl)	Fermentas, St. Leon-Roth
RNase A aus Rinderpankreas, 90%	Fluka, Buchs, Schweiz
CIAP mit Puffer (1 U/µl)	Fermentas, St. Leon-Roth
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments 150 U/200µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe

3.9. Sonstiges

Nesco-Film	Bando Chemical Ind. Ltd., Kobe, Japan
Quarzküvetten	Hellma GmbH und Co. KG, Müllheim
Lumi-Film Chemiluminiscent Detection Film	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plastikwaren	Greiner, Frickenhause
Plastikküvetten Uvette 50-2000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Saran-Folie	Dow Chemical Company, Midland, USA
Sterilfilter Rotilabo®-Spritzenfilter steril, 0,22 µm, PVDF	Roth, Karlsruhe
Halbmikro Einmalküvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchschlag
Makro-Küvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchschlag
Nylon Membranes, positively charged	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HPLC-Säule Equisil ODS, 5 µm (250 x 4 mm)	Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch

4. Ergebnisse

4.1. RNAi- und Überexpressionskonstrukte

4.1.1. RNAi-Konstrukt der HPPR

Zur Klonierung des RNAi-Konstruktes für die HPPR wurde der pHANNIBAL-Vektor verwendet. Über PCR wurde jeweils ein HPPR-Fragment mit den Schnittstellen *EcoRI/KpnI* (sense) und *BamHI/HindIII* (antisense) mit Hilfe der entsprechenden Primer aus einem pET15b-Vektor mit dem vollständigen codierenden Bereich der HPPR amplifiziert. Die Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend aufgereinigt. Der pHANNIBAL-Vektor (pHAN) wurde zuerst mit den Enzymen *EcoRI/KpnI* verdaut und das sense-Fragment einligiert und in *E.coli* eingebracht und vermehrt (Abb. 4.1. (a)). Das Plasmid eines positiven Klon mit dem sense-Fragment wurde zur Kontrolle sequenziert. Anschließend wurde der pHANNIBAL-Vektor mit dem sequenzierten sense-Fragment mit den Restriktionsenzymen *BamHI/HindIII* verdaut und das antisense-Fragment eingefügt (Abb. 4.1. (b)). Da RNAi-Konstrukte als Einzelstrang eine Haarnadelstruktur ausbilden, ist die Sequenzierung erschwert. Es wurde deshalb nur ein Restriktionsfragment des Vektors zur Sequenzierung gegeben, bei dem mit *HindIII* und *NotI* verdaut worden war. Nach erfolgreicher Sequenzierung (Abb. 4.2.) wurde das RNAi-Konstrukt mit den *NotI*-Restriktionsschnittstellen aus pHANNIBAL ausgeschnitten und in pART27 eingefügt (Abb. 4.1. (c)). Dies war das fertige Konstrukt für die Transformation von Agrobakterien und die anschließende Infektion von Pflanzenmaterial.

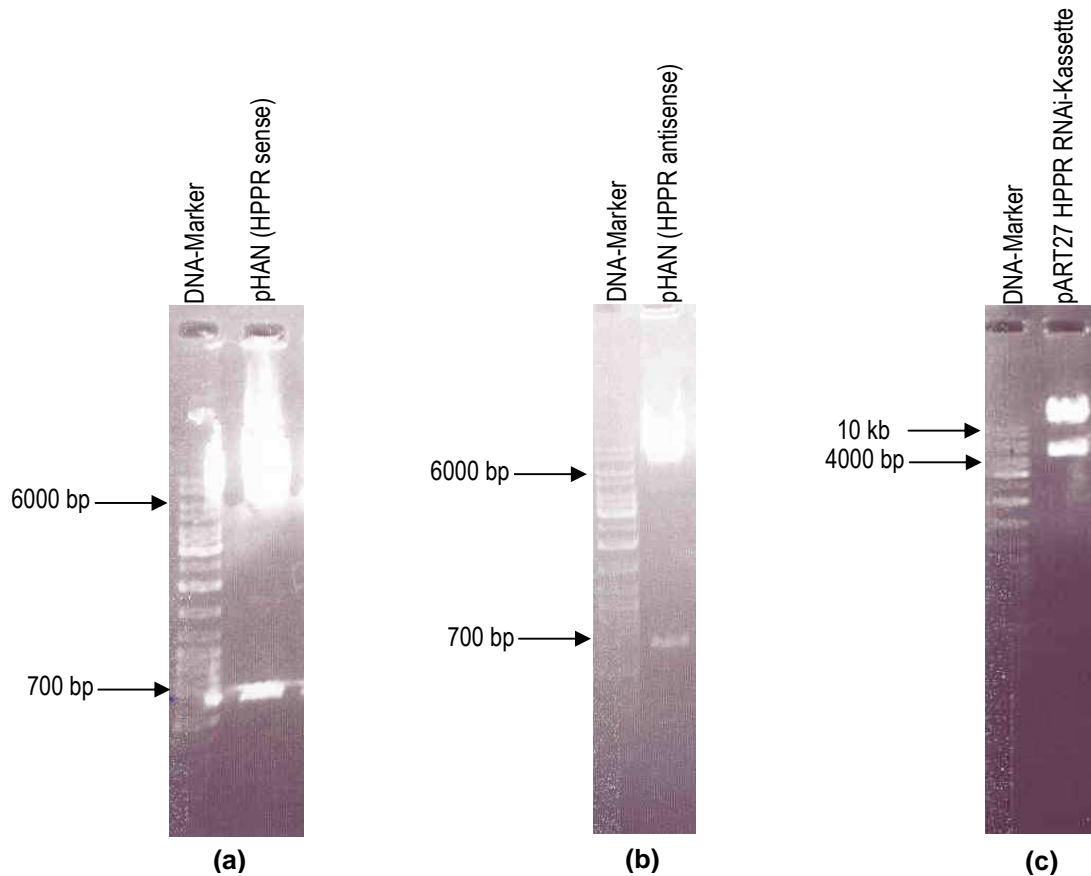


Abb. 4.1.: Restriktionsanalyse zur Kontrolle der Herstellung des RNAi-Konstrukts von HPPR. **(a)** Klonierung des HPPR sense-Fragmentes in pHAN (*EcoRI/KpnI*-Verdau); Vektor etwa 6000 bp, sense-Fragment etwa 650 bp **(b)** Klonierung des HPPR antisense-Fragmentes in pHAN (*BamHI/HindIII*-Verdau); Vektor etwa 6000 bp, antisense-Fragment etwa 650 bp **(c)** Klonierung der HPPR RNAi-Kassette in pART27 (*NotI*-Verdau); Kassette etwa 4000 bp, Vektor bei etwa 12 kb.

4. Ergebnisse

(a) Sequenz des HPPR RNAi sense-Fragments:

```

HPPR,      29  CGACGCACT-GCCGAACTGGAGATTGTGTCGAGCTTTAGCGTGGGCTGGATAAGGTTG
RNAi,      4  CTACGTGATAGATCGAACTGGAGAT-GTGTGAGCTT-AGCGTGG-TCTGGATA-GGTTG
          * * * * *
HPPR,      88  ACTTGATCAAGTGTGAGGAGAAGGGGGTTAGGGTTACCAACACGCCCGATGTGCTGACGG
RNAi,     60  ACTTGATCA-GTGTGAGGAGAAGGGGGTTAGGGTTACCAACACGCCCGATGTGCTGACGG
          * * * * *
HPPR,     148  ATGACGTCGCGGATTGGCGATCGGGTTGATTTTGGCGGTTTTGAGGCGGATTGTGAGT
RNAi,    119  ATGACGTCGCGGATTGGCGATCGGGTTGATTTTGGCGGTTTTGAGGCGGATTGTGAGT
          * * * * *
HPPR,     208  GTGATAAGTATGTGAGGAGAAGGGCGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGACGACTAAGT
RNAi,    179  GTGATAAGTATGTGAGGAGAAGGGCGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGAGGATTAAAT
          * * * * *
HPPR,     268  TCAGCGGTAAAGAGTTGGCATCATAGGATTGGGCAGAAATCGGGTTAGCAGTTGCTGAGC
RNAi,    239  TCAGCG-TAAATGAGTCTGCATCATAGGATTGGGCAGAAATCGGGTTAGCAGTTGCTGAGC
          * * * * *
HPPR,     328  GAGCAGAGGCATTGATTGTCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCCAAACACAA
RNAi,    298  GAGCAGAGGCATTGATT-TCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCCAAACACAA
          * * * * *
HPPR,     388  ACTACACATACTATGGCAGCGTTGTAGAATTGGCGTCAACAGTGACATCCTAGTCGTAG
RNAi,    357  ACTACACATACTATGGCAGCGTTGTAGAATTGGCGTCAACAGTGACATCCTAGTCGTAG
          * * * * *
HPPR,     448  CATGTCCCTGACTCCAGAAACAACTCATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCTCTGG
RNAi,    417  CATGTCCCTGACTCCAGAAACAACTCATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCTCTGG
          * * * * *
HPPR,     508  GTCCAAAGGGAGTTCTCATCAACATTGGAAGGGGACCTCATGTTGATGAGCCCGAACT
RNAi,    477  GTCCAAAGGGAGTTCTCATCAACATTGAA--GGGACCTCATGT-GATGAGCCCGAACT
          * * * * *

```

(b) Sequenz des HPPR RNAi antisense-Fragments:

```

HPPR,      38  GCCGAACTGGAGATTGTGTCGAGCTTTAGCGTGGGCTGGATAAGGTTGACTTGATCAA
RNAi,      1  GCCGAA-CTCGAGATGGTGTAGAGCTTTAGCGTGGGCTGAT--AGGTTGACTTGATCAA
          * * * * *
HPPR,      98  GTGTGAGGAGAAGGGGGTTAGGGTTACCAACACGCCCGATGTGCTGACGGATGACGTCGC
RNAi,     58  GTGTGAGGAGAAGGGGGTTAGGGTTACCAACACGCC-GATGTGCTGACGGATGACGTCGC
          * * * * *
HPPR,     158  GGATTGGCGATCGGGTTGATTTTGGCGGTTTTGAGGCGGATTGTGAGTGTGATAAGTA
RNAi,    117  GGATTGGCGATCGGGTTGATTTTGGCGGTTTTGAGGCGGATTGTGAGTGTGATAAGTA
          * * * * *
HPPR,     218  TGTGAGGAGAAGGGCGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGACGACTAAGTTGAGCGGTAA
RNAi,    176  TGAGGCGAGAGTGGTGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGAGCGGTAAAGTTGAGTGGCAA
          * * * * *
HPPR,     278  AAGAGTTGGCATCATAGGATTGGGCAGAAATCGGGTTAGCAGTTGCTGAGCGAGCAGAGGC
RNAi,    236  AAGAGTTGGCATGCTAAGCTTGGGCAGTATCTGTTAGCAGCTGTTGAGCTAGCAGAGGC
          * * * * *
HPPR,     338  ATTTGATTGTCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCCAAACAACTACACATA
RNAi,    296  ATTTGTTCTCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCCAAACAACTACACATA
          * * * * *
HPPR,     398  CTATGGCAGCGTTGTAGAATTGGCGTCAACAGTGACATCCTAGTCGTAGCATGTCCCCT
RNAi,    356  CTATGGCAGCGTTGTAGAATTGGCGTCAACAGTGACATCCTAGTCGTAGCATGTCCCCT
          * * * * *
HPPR,     458  GACTCCAGAAACAACTCATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCTCTGGTCCAAAGGG
RNAi,    416  GACTCCAGAAACAACTCATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCTCTGGTCCAAAGGG
          * * * * *
HPPR,     518  AGTTCTCATCAACATTGGAAGGGGACCTCATGTTGATGAGCCCGAACTGGTGTCTGCTCT
RNAi,    476  AGTTCTCATCAACATTG-AAGGGGACCTCATGT-GATGAGCCCGAACTG-TGCTGCTCT
          * * * * *
HPPR,     578  TGTGGAGGGCCGCTCTGGG
RNAi,     533  ---GTGAGGCGCTCTGGG
          * * * * *

```

Abb. 4.2.: Sequenzvergleich der HPPR sense- **(a)** und antisense-Fragmente (= RNAi) **(b)** aus pHAN mit der entsprechenden Teilsequenz der HPPR aus *Coleus blumei* (= HPPR). [SIM - Alignment Tool at ExPASy](#) (Geneva, Switzerland)

4.1.2. RNAi-Konstrukt der RAS

Bei der Herstellung des RNAi-Konstruktes für die RAS wurde ebenso verfahren wie bei der HPPR. Die Abbildungen 4.3. und 4.4. zeigen den Fortschritt der Konstruktion des RAS RNAi-Plasmids.

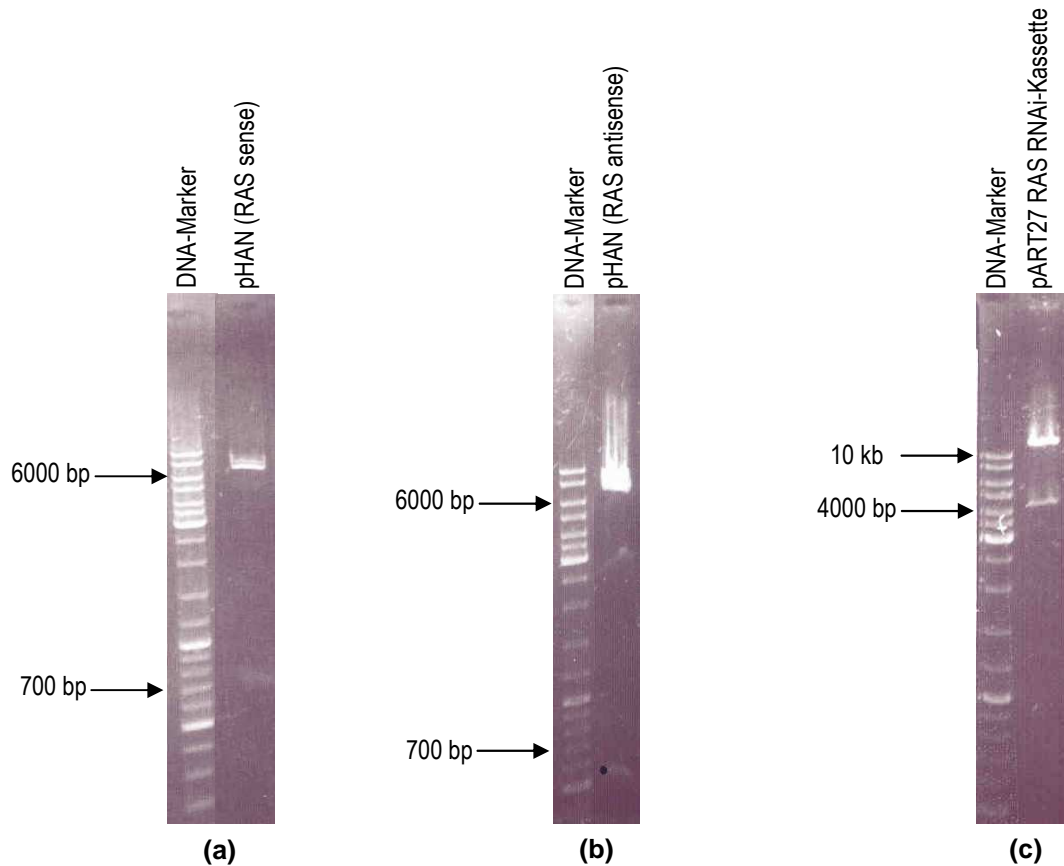


Abb. 4.3.: Restriktionsanalyse zur Kontrolle der RNAi-Konstrukte für RAS. **(a)** Klonierung des RAS sense-Fragmentes in pHAN (*EcoRI/KpnI*-Verdau); Vektor etwa 6000 bp, sense-Fragment etwa 650 bp **(b)** Klonierung des RAS antisense-Fragmentes in pHAN (*BamHI/HindIII*-Verdau); Vektor etwa 6000 bp, antisense-Fragment etwa 650 bp **(c)** Klonierung der RAS RNAi-Kassette in pART27 (*NotI*-Verdau); Kassette etwa 4000 bp, Vektor bei etwa 12 kb.

(a) Sequenz des RAS RNAi sense-Fragments:

```

RAS,      17 TCATGGTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAATGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAAACG
RNAi,      5 TTATAGCATCATCGCTA-CTCGCTTCAA-TGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAAACG
          * * * * *
          *****

RAS,      77 AGCACCACTTATCCGACGGCGTCGCCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCA
RNAi,     63 AGCACCACTTATCCGACGGCGTCGCCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCA
          *****

RAS,     137 GCCGCGCGCGCCCGCCCTACCCCGCTGCCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTC
RNAi,    123 GCCGCGCGCGCCCGCCCTACCCCGCTGCCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTC
          *****

RAS,     197 GCAACCCACCGCAGCCGAGTTTACGCCACGCCGAGTACCAGCCTCCTCCCACTCTCGAAA
RNAi,    183 GCAACCCACCGCAGCCGAGTTTACGCCACGCCGAGTACCAGCCTCCTCCCACTCTCGAAA
          *****

RAS,     257 ACCCTCTTCCCCACACGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCGCGACCACTCA
RNAi,    243 ACCCTCTTCCCCACACGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCGCGACCACTCA
          *****

RAS,     317 ACTCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCGCGCGACGGCGCGCGCAAATCCTACA
RNAi,    303 AGTCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCGCGCGACGGCGCGCGCAAATCCTACA
          *
          *****

RAS,     377 GCACGTTGAGGTTCTTGCCGGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGGCTGC
RNAi,    363 GCACGTTGAGGTTCTTGCCGGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGGCTGC
          *****

RAS,     437 CGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTCCACATCCCCTT-CGACGG-CCGCGGCAGGCTGCAGCT
RNAi,    423 CGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTGAATACCCTCTAGCTTCGGACCATCACATGCCGC--CT
          *****
          * * * * *

RAS,     495 GC-CGCCGGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGCG
RNAi,    481 GCGCGACTTGACTCACTCGTAACCTGGGTGTGGAAC-TGGTTCCATCACCTCAGTTGGTT
          * * * * *
          * * * * *

RAS,     554 AGATCGAGTCGAACTCGCTGAATTACGCCGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGC
RNAi,    540 TATTGGAATTTTAGCGGAGGACATT---TTTGTGATCACATGAAGGAATTCGACAGAG
          * * * * *
          * * * * *

RAS,     614 TGGATGAGGACTACCTGCGATCGTCGATCGAT
RNAi,    596 AATGATTTTCCTTCCCTCAGACTCCTTTCGAT
          * * * * *
          * * * * *

```

(b) Sequenz des RAS RNAi antisense-Fragments:

```

RAS,      17 TCATGGTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAATGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAAACG
RNAi,      5 TTATAGCATCATCGCTA-CTCGCTTCAA-TGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAAACG
          * * * * *
          *****

RAS,      77 AGCACCACTTATCCGACGGCGTCGCCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCA
RNAi,     63 AGCACCACTTATCCGACGGCGTCGCCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCA
          *****

RAS,     137 GCCGCGCGCGCCCGCCCTACCCCGCTGCCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTC
RNAi,    123 GCCGCGCGCGCCCGCCCTACCCCGCTGCCGCACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTC
          *****

RAS,     197 GCAACCCACCGCAGCCGAGTTTACGCCACGCCGAGTACCAGCCTCCTCCCACTCTCGAAA
RNAi,    183 GCAACCCACCGCAGCCGAGTTTACGCCACGCCGAGTACCAGCCTCCTCCCACTCTCGAAA
          *****

RAS,     257 ACCCTCTTCCCCACACGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCGCGACCACTCA
RNAi,    243 ACCCTCTTCCCCACACGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCGCGACCACTCA
          *****

RAS,     317 ACTCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCGCGCGACGGCGCGCGCAAATCCTACA
RNAi,    303 AGTCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCGCGCGACGGCGCGCGCAAATCCTACA
          *
          *****

RAS,     377 GCACGTTGAGGTTCTTGCCGGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGGCTGC
RNAi,    363 GCACGTTGAGGTTCTTGCCGGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGGCTGC
          *****

RAS,     437 CGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTCCACATCCCCTT-CGACGG-CCGCGGCAGGCTGCAGCT
RNAi,    423 CGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTGAATACCCTCTAGCTTCGGACCATCACATGCCGC--CT
          *****
          * * * * *

RAS,     495 GC-CGCCGGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGCG
RNAi,    481 GCGCGACTTGACTCACTCGTAACCTGGGTGTGGAAC-TGGTTCCATCACCTCAGTTGGTT
          * * * * *
          * * * * *

RAS,     554 AGATCGAGTCGAACTCGCTGAATTACGCCGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGC
RNAi,    540 TATTGGAATTTTAGCGGAGGACATT---TTTGTGATCACATGAAGGAATTCGACAGAG
          * * * * *
          * * * * *

RAS,     614 TGGATGAGGACTACCTGCGATCGTCGATCGAT
RNAi,    596 AATGATTTTCCTTCCCTCAGACTCCTTTCGAT
          * * * * *
          * * * * *

```

Abb. 4.4.: Sequenz-Alignent der RAS sense **(a)** und antisense-Fragmente **(b)** (= RNAi) aus pHAN mit der entsprechenden Teilsequenz der RAS aus *Coleus blumei* (= RAS).

4.1.3. Überexpressionskonstrukt der HPPR

Das vollständige offene Leseraster der HPPR wurde mit Primern, die die entsprechenden Schnittstellen enthielten (vorderer Primer: *XhoI* und hinterer Primer: *BamHI*) aus dem pET15b-Vektor (pET15b-HPPR wurde im Rahmen ihrer Doktorarbeit von V. Janiak hergestellt) amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und hinter den 35S-Promotor in pHAN ligiert (Abb. 4.5. (a)). Aus pHAN wurde mit *NotI* die Expressionskassette herausgeschnitten und in pART27 eingefügt (Abb. 4.5. (b)). Zur Überprüfung wurde die HPPR aus pART27 sequenziert. Die Sequenz stimmt zu 100% mit der ursprünglichen aus *Coleus blumei* ermittelten HPPR-Sequenz überein (Abb. 4.6.).

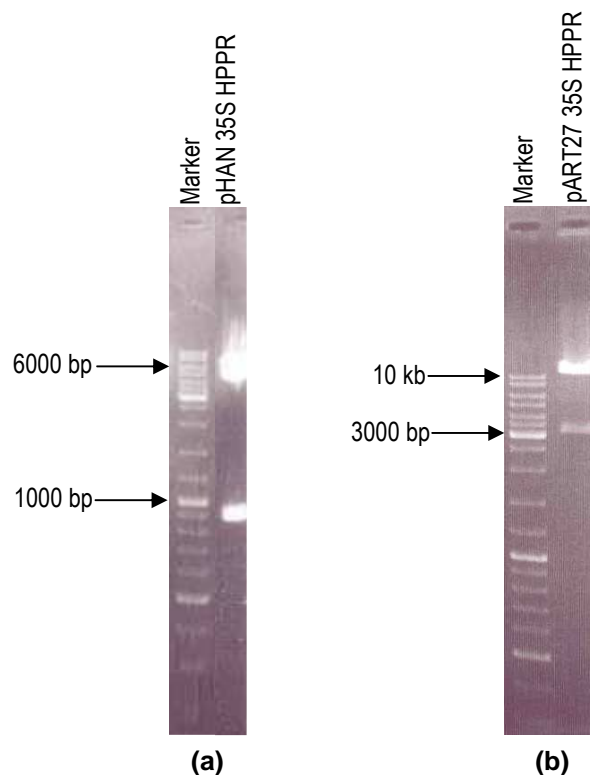


Abb. 4.5.: Restriktionsanalyse zur Kontrolle der Überexpressions-Konstrukte der HPPR. **(a)** Klonierung der Volllängen-HPPR in pHAN (Verdau mit *XhoI* und *BamHI*), Vektor etwa 6000 bp, HPPR etwa 950 bp; **(b)** Ligation der HPPR-Überexpressionskassette aus pHAN in pART27 (*NotI*-Verdau); Vektor 12 kb, Expressionskassette 3000 bp.

Sequenz der HPPR im Überexpressionskonstrukt		
Original,	1	ATGGAGGCGATTGGCGTTTTGATGATGTGCCCCGATGAGCACCTACTTGGAGCAAGAGCTT
Kloniert,	1	ATGGAGGCGATTGGCGTTTTGATGATGTGCCCCGATGAGCACCTACTTGGAGCAAGAGCTT

Original,	61	GACAAGCGGTTCAAGCTCTTTCGTTACTGGACTCAGCCGGCGCAGCGGACTTCCTCGCT
Kloniert,	61	GACAAGCGGTTCAAGCTCTTTCGTTACTGGACTCAGCCGGCGCAGCGGACTTCCTCGCT

Original,	121	CTGCAGGCCGAGTCTATCCGCGCGGTGGTTGGGAATTCGAACGCCGGTGCCGATGCTGAG
Kloniert,	121	CTGCAGGCCGAGTCTATCCGCGCGGTGGTTGGGAATTCGAACGCCGGTGCCGATGCTGAG

Original,	181	TTGATCGACGCACTGCCGAACTGGAGATTGTGTCGAGCTTTAGCGTGGGTCTGGATAAG
Kloniert,	181	TTGATCGACGCACTGCCGAACTGGAGATTGTGTCGAGCTTTAGCGTGGGTCTGGATAAG

Original,	241	GTTGACTTGATCAAGTGTGAGGAGAAGGGGTTAGGGTTACCAACACGCCCGATGTGCTG
Kloniert,	241	GTTGACTTGATCAAGTGTGAGGAGAAGGGGTTAGGGTTACCAACACGCCCGATGTGCTG

Original,	301	ACGGATGACGTCGCGGATTGGCGCATCGGGTTGATTTGGCGGTTTGGAGCGGATTGT
Kloniert,	301	ACGGATGACGTCGCGGATTGGCGCATCGGGTTGATTTGGCGGTTTGGAGCGGATTGT

Original,	361	GAGTGTGATAAGTATGTGAGGAGAGGGGCGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGACGACT
Kloniert,	361	GAGTGTGATAAGTATGTGAGGAGAGGGGCGTGGAAATTTGGAGACTTCAAGTTGACGACT

Original,	421	AAGTTACGCGGTAAAAGAGTTGGCATCATAGGATTGGGCAGAATCGGGTTAGCAGTTGCT
Kloniert,	421	AAGTTACGCGGTAAAAGAGTTGGCATCATAGGATTGGGCAGAATCGGGTTAGCAGTTGCT

Original,	481	GAGCGAGCAGAGGCATTTGATTGTCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCCAAC
Kloniert,	481	GAGCGAGCAGAGGCATTTGATTGTCCAATCAGTTACTTTTCAAGATCCAAGAAACCCAAC

Original,	541	ACAACTACACATACTATGGCAGCGTTGAGAATTGGCGTCAAACAGTGACATCCTAGTC
Kloniert,	541	ACAACTACACATACTATGGCAGCGTTGAGAATTGGCGTCAAACAGTGACATCCTAGTC

Original,	601	GTAGCATGTCCCCTGACTCCAGAAACAACATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCT
Kloniert,	601	GTAGCATGTCCCCTGACTCCAGAAACAACATATTATCAATCGAGAAGTAATCGATGCT

Original,	661	CTGGGTCCAAAGGGAGTTCTCATCAACATTGGAAGGGGACCTCATGTTGATGAGCCCGAA
Kloniert,	661	CTGGGTCCAAAGGGAGTTCTCATCAACATTGGAAGGGGACCTCATGTTGATGAGCCCGAA

Original,	721	CTGGTGTCTGCTCTTGTGGAGGGCCGCTGGGTGGCGCTGGTCTTGATGATTCGAAAGG
Kloniert,	721	CTGGTGTCTGCTCTTGTGGAGGGCCGCTGGGTGGCGCTGGTCTTGATGATTCGAAAGG

Original,	781	GAACGAGAGGTACCGGAGAAGCTCTTCGGTCTGGAAATGTTGCTGTTGCCACATGTA
Kloniert,	781	GAACGAGAGGTACCGGAGAAGCTCTTCGGTCTGGAAATGTTGCTGTTGCCACATGTA

Original,	841	GGGAGTGGCACCCTGGAAACGCGTAAAGTGATGGCTGATCTTGTGTCGGAAACTTGGAA
Kloniert,	841	GGGAGTGGCACCCTGGAAACGCGTAAAGTGATGGCTGATCTTGTGTCGGAAACTTGGAA

Original,	901	GCTCACTTCTCCGGCAAGCCTCTCTTAACCTCCAGTAGTTTGA
Kloniert,	901	GCTCACTTCTCCGGCAAGCCTCTCTTAACCTCCAGTAGTTTGA

Abb. 4.6.: Sequenzvergleich der HPPR-Volllänge (= kloniert) aus pART27 mit der HPPR-Sequenz (= Original) aus *Coleus blumei*. Die Sequenz wurde vollständig sequenziert, sie stimmt zu 100% mit der Original-Sequenz überein.

4.1.4. Überexpressionskonstrukt der RAS

Der vollständige kodierende Bereich der RAS wurde mit Primern, die die entsprechenden Schnittstellen enthielten aus dem pET15b-Vektor (pET15b-RAS wurde von M. Petersen hergestellt) amplifiziert (vorderer Primer: *EcoRI*, hinterer Primer: *BamHI*), mit den Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und in pHAN ligiert (Abb. 4.7. (a)). Aus pHAN wurde mit *NotI* die Expressionskassette herausgeschnitten und in den Vektor pART27 eingebracht (Abb. 4.7. (b)). Die RAS aus pART27 wurde zur Überprüfung sequenziert (Abb. 4.8.), wobei jedoch sowohl am Anfang als auch am Ende der Sequenz 33 bp fehlen. Es fehlen sowohl am Anfang als auch am Ende der Sequenz 33 bp. Die Sequenz der in pART27 klonierten RAS stimmt mit der original RAS zu 99,8% über ein. In Abb. 4.8. sind die zwei auftretenden Punktmutationen rot markiert. Die Mutation bei Base 354 ist eine stille Mutation. Bei der Mutation von Base 565 wird statt Serin Prolin kodiert. Das Prolin befindet sich kurz vor dem Loop, der die beiden Domänen des Proteins verbindet (Abb. 4.9.).

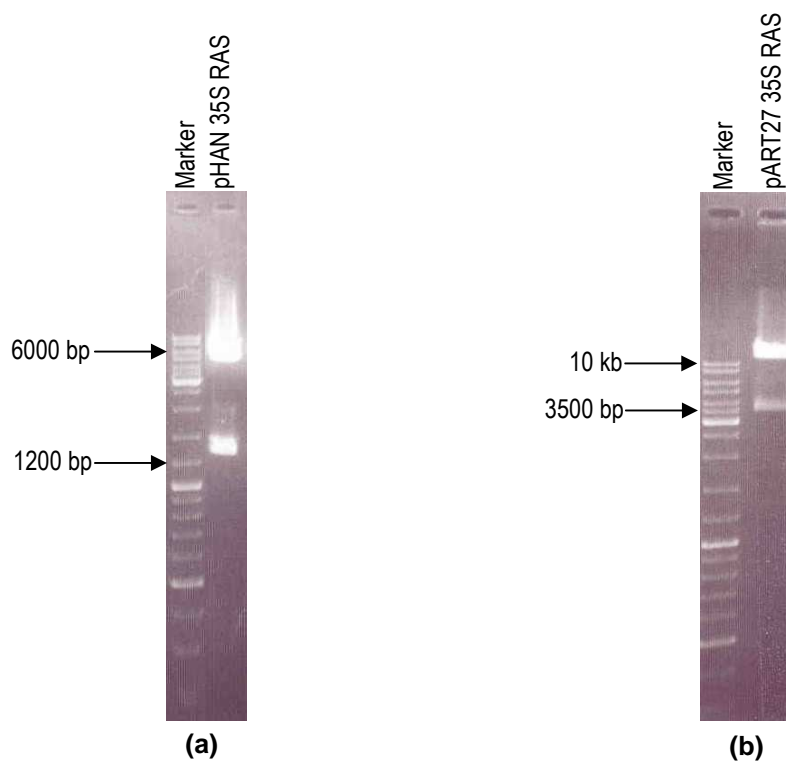


Abb. 4.7.: Restriktionsanalyse zur Kontrolle der Ligation der RAS-Sequenz in pART27 zur Überexpression. **(a)** Klonierung der Vollängen-RAS in pHAN (Verdau mit *EcoRI* und *BamHI*), Vektor 6000 bp, RAS 1300 bp; **(b)** Klonierung der RAS-Überexpressionskassette aus pHAN in pART27 (*NotI*-Verdau) Vektor 12 kb, Expressionskassette 3500 bp.

4. Ergebnisse

Sequenz der RAS im Überexpressionskonstrukt		
99.8% identity in 1227 residues overlap; Score: 7874.0; Gap frequency: 0.0%		
Original, Kloniert,	34 1	AAGCCGTCGGCGGAGACGCCGGGGGGAGTTTGTGGCTCTCAAATTTGGACTTGTGTGCG AAGCCGTCGGCGGAGACGCCGGGGGGAGTTTGTGGCTCTCAAATTTGGACTTGTGTGCG *****
Original, Kloniert,	94 61	CCGGCCAACTACCACACCTCAGCGTGCATTCTACAGCCACGACGGCTCCGACAACCTC CCGGCCAACTACCACACCTCAGCGTGCATTCTACAGCCACGACGGCTCCGACAACCTC *****
Original, Kloniert,	154 121	TTCGACGCGCGGGGTTGAAGGAGTCGCTCAGCCGAGCTCTGGTTGAGTTCTACCTTAC TTCGACGCGCGGGGTTGAAGGAGTCGCTCAGCCGAGCTCTGGTTGAGTTCTACCTTAC *****
Original, Kloniert,	214 181	GCGGGGAGGTTGAAGCTGAACGGCAACCGCTCGAGATCGACTGTAACAACGAGGGGTTG GCGGGGAGGTTGAAGCTGAACGGCAACCGCTCGAGATCGACTGTAACAACGAGGGGTTG *****
Original, Kloniert,	274 241	CTGTTGGTGGAGGCGGAGTGCAGCGCGCGTTGGATGAGCTCGGCGACTTCGCCCCCGC CTGTTGGTGGAGGCGGAGTGCAGCGCGCGTTGGATGAGCTCGGCGACTTCGCCCCCGC *****
Original, Kloniert,	334 301	CCGGAGCTCAACCTCATCCCTAAAGTGGATTATTCTCGAGGAATTTCACATACCTCTC CCGGAGCTCAACCTCATCCCTAAAGTGGATTATTCTCGAGGAATTTCACATACCTCTC *****
Original, Kloniert,	394 361	ATGGTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAATGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAACGAG ATGGTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAATGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAACGAG *****
Original, Kloniert,	454 421	CACCACTTATCCGACGCGCTCGCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCAGC CACCACTTATCCGACGCGCTCGCGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACCTCAGC *****
Original, Kloniert,	514 481	CGCAGCGCCCCGCCCCCTACCCCGCTGCCGACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTCGC CGCAGCGCCCCGCCCCCTACCCCGCTGCCGACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTCGC *****
Original, Kloniert,	574 541	AACCCACCGCAGCCGAGTTCAGCCACGCGAGTACCAGCTCCTCCACTCTCGAAAAAC AACCCACCGCAGCCGAGTTCAGCCACGCGAGTACCAGCTCCTCCACTCTCGAAAAAC *****
Original, Kloniert,	634 601	CCTCTTCCCCACACCGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCCGCGACGAGTCAAC CCTCTTCCCCACACCGACATCGCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCCGCGACGAGTCAAC *****
Original, Kloniert,	694 661	TCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCCGCGACGGCGCGCGGCAAACTCTACAGC TCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCCCCGCGACGGCGCGCGGCAAACTCTACAGC *****
Original, Kloniert,	754 721	ACGTTTCAGGTTCTTGGCGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGCCTGCCG ACGTTTCAGGTTCTTGGCGCCATATCTGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCGCGCCTGCCG *****
Original, Kloniert,	814 781	GAGGTCGAAGAGACCAAGCTCCACATCCCTTCGACGGCGCGGCGAGGCTGCAGTGCAG GAGGTCGAAGAGACCAAGCTCCACATCCCTTCGACGGCGCGGCGAGGCTGCAGTGCAG *****
Original, Kloniert,	874 841	CCGGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGCGAGATC CCGGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGCGAGATC *****
Original, Kloniert,	934 901	GAGTCGAACCTCGCTGAATTACGCCGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGTGGAT GAGTCGAACCTCGCTGAATTACGCCGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGTGGAT *****
Original, Kloniert,	994 961	GAGGACTACCTGCGATCGTCGATCGATTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTG GAGGACTACCTGCGATCGTCGATCGATTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTG *****
Original, Kloniert,	1054 1021	GCGCAGGGAGCTCAGATTTCAGGTGCCCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTG GCGCAGGGAGCTCAGATTTCAGGTGCCCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTG *****
Original, Kloniert,	1114 1081	CCGATTTACGAGCCGATTTCGGGTGGGGGAAGGCGGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCG CCGATTTACGAGCCGATTTCGGGTGGGGGAAGGCGGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCG *****
Original, Kloniert,	1174 1141	CCGTTTGAAGGGAAGAGCTACCTTCTGCCTAACCCGGAAAAAGATGGCAGCTTGTTCGTC CCGTTTGAAGGGAAGAGCTACCTTCTGCCTAACCCGGAAAAAGATGGCAGCTTGTTCGTC *****
Original, Kloniert,	1234 1201	TCCATCACTCTGCATAAGCAACACATG TCCATCACTCTGCATAAGCAACACATG *****

Abb. 4.8.: Sequenzvergleich der RAS-Volllänge aus pART27 (= kloniert) mit der Original-RAS-Sequenz (= Original). Die in pART27 klonierte RAS ist 99,8% mit der Original-RAS identisch. An Stelle 354 und 565 sind Punktmutationen rot markiert.

99.8% identity in 409 residues overlap; Score: 2196.0; Gap frequency: 0.0%		
Original,	12	KPSAETPGGSLWLSNLDLLSPANYHTLSVHFYSHDGSNFFDAAGLKESLSRALVEFYYP
Kloniert,	1	KPSAETPGGSLWLSNLDLLSPANYHTLSVHFYSHDGSNFFDAAGLKESLSRALVEFYYP

Original,	72	AGRLKLNNGNRLEIDCNNEGLLLVEAECDCGALDELGDFAPRPELNLIKVDYSRGISTYPL
Kloniert,	61	AGRLKLNNGNRLEIDCNNEGLLLVEAECDCGALDELGDFAPRPELNLIKVDYSRGISTYPL

Original,	132	MVFQLTRFKCGGVALGVANEHHLSDGVAALHFINTWAHLRSAPAPTPLPHFDRSSLSAR
Kloniert,	121	MVFQLTRFKCGGVALGVANEHHLSDGVAALHFINTWAHLRSAPAPTPLPHFDRSSLSAR

Original,	192	NPPQPQFSHAQYQPPPTLENPLPHTDIAHSRFLKTRDQLNSLKSFKTAPADGGAGKSYS
Kloniert,	181	NPPQPQFSHAQYQPPPTLENPLPHTDIAHSRFLKTRDQLNSLKSFKTAPADGGAGKSYS

Original,	252	TFEVLAGHIWRSVCIARGLPEQETKLHIPFDGRGRLQLPPGFFGNAIFFATPIATCGEI
Kloniert,	241	TFEVLAGHIWRSVCIARGLPEQETKLHIPFDGRGRLQLPPGFFGNAIFFATPIATCGEI

Original,	312	ESNSLNYAVRRVSDGVSRLDEDLRSSIDFLELQEDISKLAQGAHSFRCPNLWVISWVWL
Kloniert,	301	ESNSLNYAVRRVSDGVSRLDEDLRSSIDFLELQEDISKLAQGAHSFRCPNLWVISWVWL

Original,	372	PIYEPDFGWGKAVYMGFWAAPFEGKSYLLPNPEKDGSFVSIHLKHQHM
Kloniert,	361	PIYEPDFGWGKAVYMGFWAAPFEGKSYLLPNPEKDGSFVSIHLKHQHM

Abb. 4.9.: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der Original-RAS (= Original) mit der für die Überexpression klonierten RAS (= Kloniert). Der Aminosäureaustausch von Serin nach Prolin ist rot markiert. Die gelbe Markierung zeigt den Bereich des Loops an, der die zwei Domänen des Proteins verbindet.

4.2. Ermittlung der besten Kombination von *Coleus blumei*-Linien mit verschiedenen *Agrobacterium rhizogenes*-Stämmen

4.2.1. Transformationsraten und stabile Flüssigkulturen für weitere Verwendung

Um die Transformation zu optimieren, wurden in Vorarbeiten von Anke Behrens verschiedene *Coleus blumei*-Pflanzenlinien mit drei unterschiedlichen Stämmen von *Agrobacterium rhizogenes* infiziert. Dies sollte dazu dienen, die beste Pflanzen-Agrobakterien-Kombination auszuwählen. Zusätzlich zu diesen Wildtyp-Transformationen wurden in dieser Arbeit mehrere Pflanzenlinien mit HPPR-RNAi-Konstrukten mithilfe verschiedener *Agrobacterium rhizogenes*-Stämme transformiert, um die Qualität der RNAi-Effekte in den verschiedenen Hairy Root-Linien zu überprüfen.

Es wurden folgende sterile Sprosskulturen von *Coleus blumei* verwendet: V1, V3, V4 und V6. Die verwendeten Agrobakterienstämme waren LBA15834 (auch ATCC 15834 genannt), TR105 und LBA9402. Zur Herstellung der RNAi-Linien wurden nur die Pflanzenlinien V1, V3 und V4 verwendet und die Agrobakterienstämme LBA15834 und TR105. Die kultivierten Hairy Roots und ihre Pflanzen/Agrobakterienkombinationen sind in Tabelle 4.1. aufgelistet. AHR-x bezeichnet die „Wildtyp“-Transformationen ohne Konstrukt, HR-x steht für die HPPR-RNAi-Linien. Die Transformationsraten der HPPR-RNAi-Linien sind in der Tabelle 4.2.

aufgeführt. Die Transformationsrate bezieht sich nur auf die überlebenden, kanamycinresistenten Wurzeln, die aus jeweils sechs *Coleus blumei*-Blättern stammen.

Gesamttransformationsraten wurden nicht festgehalten. Die Aufzeichnungen zu den AHR-Linien von Anke Behrens waren nicht ausreichend zur Ermittlung der Transformationsraten, es wurde jedoch LBA15834 als am besten geeigneter Agrobakterienstamm empfohlen, da er die lebensfähigsten Hairy Roots lieferte (persönliche Korrespondenz).

	Hairy Root-Linie	<i>Coleus</i> -Pflanzen-Linie	Agrobakterienstamm
„Wildtyp“-Transformation	AHR-1	V3	LBA 15834
	AHR-2	V6	TR 105
	AHR-3	V4	LBA 15834
	AHR-4	V3	LBA 9402
	AHR-5	V4	LBA 9402
	AHR-6	V1	LBA 9402
	AHR-7	V1	LBA 15834
HPPR-RNAi-Transformation	HR-A	V1	LBA 15834
	HR-B	V3	LBA 15834
	HR-C	V3	LBA 15834
	HR-D	V4	LBA 15834
	HR-E	V1	LBA 15834
	HR-F	V3	LBA 15834
	HR-G	V1	LBA 15834
	HR-H	V3	LBA 15834
	HR-I	V3	LBA 15834
	HR-J	V1	LBA 15834
	HR-K	V3	TR 105
	HR-L	V1	TR 105
	HR-R	V4	LBA 15834

Tabelle 4.1.: Auflistung der Pflanzen/Agrobakterien-Kombinationen der gewonnenen Hairy Roots und deren Kulturbezeichnungen. Rot markierte Kulturen HR-B und HR-J wurden teilweise mit charakterisiert, sind jedoch durch Kontaminationen frühzeitig aus den Untersuchungen ausgeschieden. AHR-x („Wildtyp“-Transformationen), HR-x (HPPR RNAi-Transformationen).

Pflanzen-Linie	Agrobakterienstamm	Gewonnene Hairy Roots der HPPR RNAi	Transformationsrate
V1	LBA 15834	10 Wurzeln aus 6 Blättern, 7 in Flüssigkultur gestartet, 3 in stabiler Kultur erhalten	33,3 %
V3	LBA 15834	13 Wurzeln aus 6 Blättern, 5 in Flüssigkultur gestartet, 4 in stabiler Kultur erhalten	30,8 %
V4	LBA 15834	9 Wurzeln aus 6 Blättern, 1 in Flüssigkultur gestartet, 2 in stabiler Kultur erhalten	22,2 %
V1	TR 105	11 Wurzeln aus 6 Blättern, 7 in Flüssigkultur gestartet, 1 in stabiler Kultur erhalten	8,3 %
V3	TR 105	12 Wurzeln aus 6 Blättern, 4 in Flüssigkultur gestartet, 1 in stabiler Kultur erhalten	8,3 %
V4	TR 105	7 Wurzeln aus 6 Blättern, 0 in Flüssigkultur gestartet, 0 in stabiler Kultur erhalten	0 %

Tabelle 4.2.: Transformationsraten der verschiedenen Pflanzen/Agrobakterien-Kombinationen für die HR-Linien.

9 der insgesamt 11 Hairy Root HPPR-RNAi-Linien stammen von dem Agrobakterienstamm LBA 15834, 2 von dem Agrobakterienstamm TR 105. Das heißt 81,8 % der Hairy Roots wurden von LBA15834 hervorgerufen. Laut Literatur ist dies auch einer der virulenteren Agrobakterienstämme in Bezug auf *Coleus blumei* (Saleh und Thuc, 2009).

4.2.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Hairy Root-Kulturen

Die stabilen Flüssigkulturen der Hairy Roots wurden molekularbiologisch auf die Abwesenheit von Agrobakterien, die agrobakterienbedingte Transformation, die Anwesenheit des Konstrukts und die HPPR-Expressionslevel getestet.

4.2.2.1. Test auf die Abwesenheit von Agrobakterien

Um die Hairy Root-Kulturen auf die Anwesenheit von Agrobakterien zu testen, wurde gesamte genomische DNA isoliert und eine PCR mit *virC*-Primern durchgeführt. *Vir*-Gene liegen auf den Virulenzplasmiden (R_i-Plasmid bei *Agrobacterium rhizogenes*), die in den verwendeten Agrobakterien-Stämmen enthalten sind. Dies diente der Kontrolle, ob die Kulturen frei von Agrobakterien waren. Abb. 4.12. zeigt diese Kontroll-PCR. Als positive Kontrolle diente reine Agrobakterien-DNA und als negative Kontrolle wurde steriles Wasser statt Template verwendet. Nur AHR-1 zeigt eine *virC*-Bande der Größe 700 bp wie die Positiv-Kontrolle, alle anderen Kulturen zeigen kein PCR-Amplifikat von *virC* und sind somit frei von Agrobakterien.

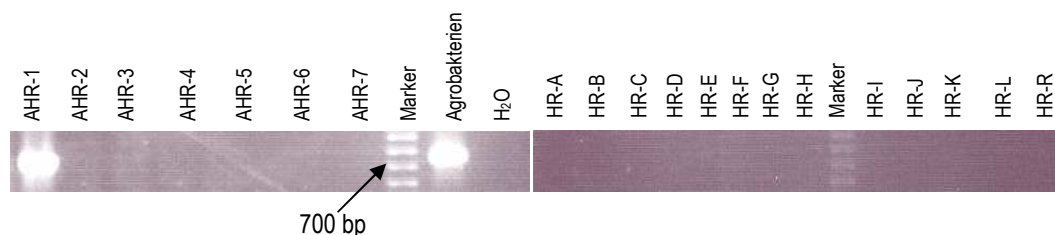


Abb. 4.10.: PCR mit *virC*-Primern auf genomischer DNA zum Test auf die Abwesenheit von *Agrobacterium rhizogenes* in Hairy Root-Flüssigkulturen.

4.2.2.2. Test auf Anwesenheit des HPPR-RNAi-Konstrukts

Die Hairy Roots wurden auf die Anwesenheit des eingebrachten HPPR-RNAi-Konstruktes kontrolliert. Dabei wurde mit Primern für den 35S-Promotorbereich der Expressionskassette aus gesamter genomischer DNA ein Produkt von 700 bp amplifiziert. Als Negativ-Kontrolle dienten die untransformierten AHR-Kulturen sowie steriles Wasser, DNA von *Coleus blumei*-Wurzeln und die Agrobakterien-DNA. Die AHR-Kulturen und die Negativ-Kontrollen zeigen

keine Bande bei 700 bp, die HR-Kulturen hingegen zeigen alle ein entsprechendes PCR-Produkt (siehe Abb. 4.11.).

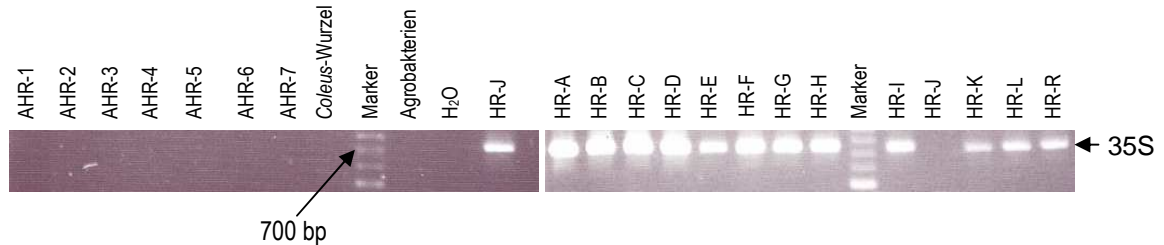


Abb. 4.11.: Kontroll-PCR auf das eingebrachte HPPR-RNAi-Konstrukt mit 35S-Primern auf genomische DNA.

4.2.2.3. Test auf agrobakterienbedingte Transformation

Um die agrobakterienbedingte Transformation der Wurzelkulturen zu bestätigen und um Effekte der *rol*-Gene auszuschließen, wurde auf genomischer Gesamt-DNA PCR mit den Primern für *rolA*, *rolB* und *rolC* gemacht. Es sollten alle drei Gene vorhanden sein, die Amplifikate sollten die folgenden Größen aufweisen: 200 bp (*rolA*), 650 bp (*rolB*) und 450 bp (*rolC*). Als Positiv-Kontrolle diente DNA der Agrobakterienstämme LBA15834 und TR105; es konnten alle drei *rol*-Gene amplifiziert werden. Als Negativ-Kontrolle wurden untransformierte *Coleus blumei*-DNA und steriles Wasser verwendet, dort ist kein Produkt zu sehen. Bei fast allen Kulturen wurden die drei *rol*-Gene amplifiziert, nur AHR-3 zeigt keine Banden (Abb. 4.12.). Vermutlich war die DNA dieser Präparation verunreinigt, da bei einer Wiederholung auch AHR-3 die drei *rol*-Gene zeigte (nicht abgebildet).

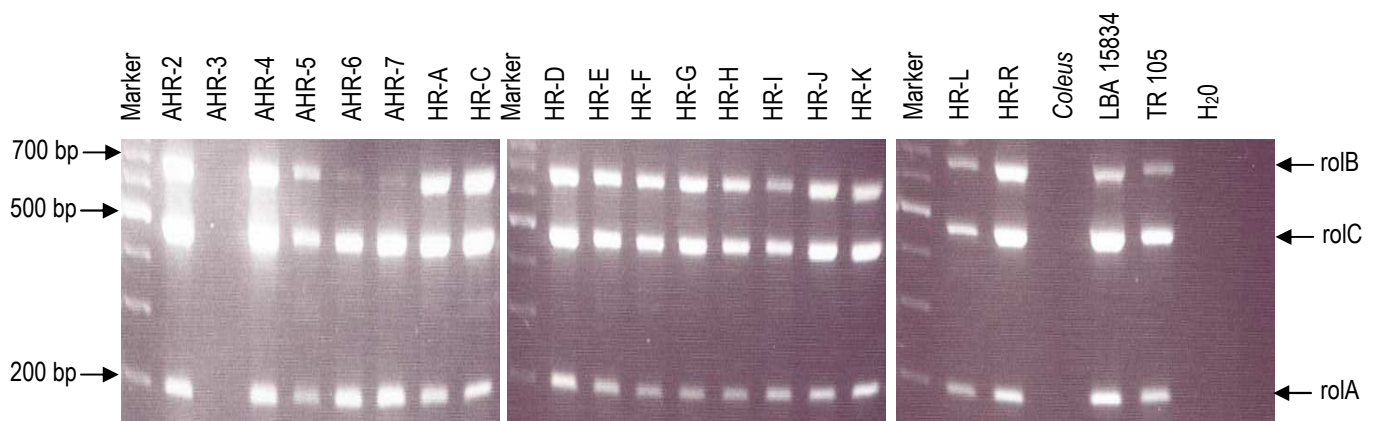


Abb. 4.12.: PCR auf genomischer DNA mit *rolA*-, *rolB*- und *rolC*-Primern. Bis auf AHR-3 zeigen alle Linien die entsprechenden Banden für *rolA* (200 bp), *rolB* (650 bp) und *rolC* (450 bp). Als positive Kontrolle diente die Agrobakterien-DNA von LBA15834 und TR105. Als negative Kontrolle wurden untransformierte *Coleus blumei*-DNA und steriles Wasser verwendet.

4.2.2.4. Bestimmung der HPPR-mRNA-Level in den verschiedenen Hairy Root-Linien

Nach der Isolation von RNA aus den Hairy Roots und dem Umschreiben der RNA zu cDNA wurde eine semiquantitative Duplex-PCR mit Aktin-Primern und HPPR-Primern durchgeführt, um die Funktion der RNAi-Konstrukte zu überprüfen. Aktin diene als interner Standard. Die AHR-Linien und *Coleus blumei*-cDNA dienten zum Vergleich der HPPR-Level in Wildtyp- und HPPR RNAi-Linien. Die AHR-Linien und die *Coleus blumei*-cDNA sind positiv für Aktin (etwa 120 bp) und HPPR (etwa 950 bp). Von den HR-Linien zeigen alle den internen Standard Aktin. Die Linien HR-A, HR-I, HR-L und HR-R zeigen zusätzlich HPPR-Produkt. Die Linien HR-C, -D, -E, -F, -G, -H, -J und -K zeigen keine Expression der HPPR mehr. In HR-A und HR-L ist eine deutliche, in HR-R eine schwache Expression nachzuweisen (Abb. 4.13.).

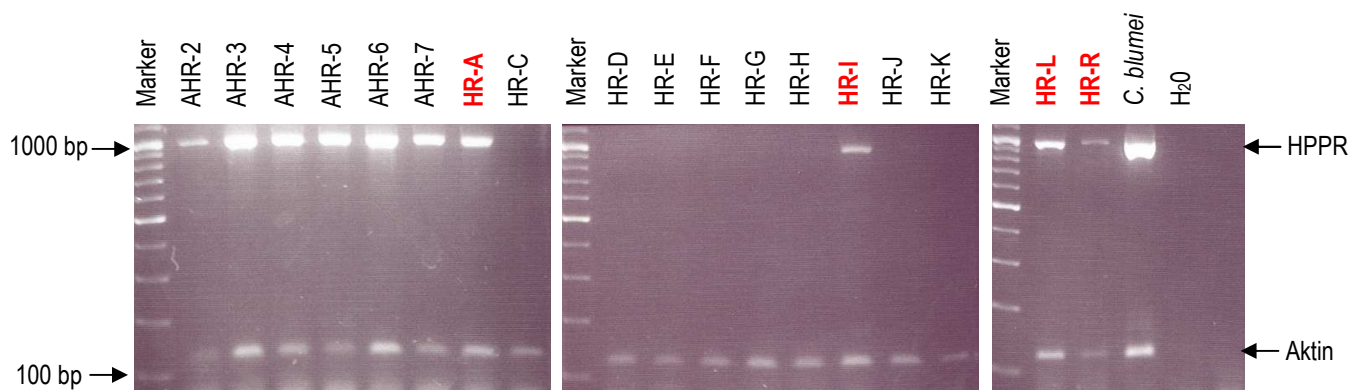


Abb. 4.13.: PCR zur Kontrolle der Funktion der RNAi-Konstrukte. Es wurde eine semiquantitative PCR mit Aktin- und HPPR-Primern auf cDNA durchgeführt. Fett/rot markiert sind HPPR-RNAi-Linien, die ein Amplifikat für HPPR zeigen.

4.2.3. Vergleich der Rosmarinsäuregehalte in den AHR-Linien und den HPPR RNAi-Linien

Für eine weitere Analyse der Hairy Root-Linien zur Überprüfung der Effektivität der RNAi-Transformanten wurde Pflanzenmaterial nach 14 Kulturtagen geerntet, eingefroren und gefriergetrocknet. Aus diesem gefriergetrockneten Pflanzenmaterial wurde Rosmarinsäure extrahiert und die Extrakte an der HPLC vermessen. Der Gehalt an Rosmarinsäure ist als % Rosmarinsäure bezogen auf das Trockengewicht angegeben (Abb. 4.16.). Die verschiedenen Linien sind graphisch nach ihrem ursprünglich verwendeten Pflanzenmaterial zusammengefasst. Zusätzliche Kontrollwerte lieferten die für die Transformationen verwendeten Pflanzenkulturen, sie sind in den Graphen als Col Vx bezeichnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei Ernten ermittelt. Die Kulturen von Col V1 (Abb. 4.14. (a)) zeigen Rosmarinsäuregehalte von 1 bis 1,5 %, die HR-Linien, bei denen ein erfolgreiches RNAi-Silencing nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 4.2.2.4),

zeigen einen deutlich geringeren Gehalt an Rosmarinsäure. Linien, bei denen durch PCR kein Silencing bestätigt werden konnte, zeigen mit den AHR-Linien vergleichbare Gehalte. Die Col V3-Linien (Abb. 4.14. (b)) weisen allgemein geringere Rosmarinsäuregehalte auf. Es ist kein Unterschied zwischen Kulturen mit und ohne erfolgreichem Silencing festzustellen. Vergleichbar sieht es bei den Col V4-Linien aus (Abb. 4.14. (c)).

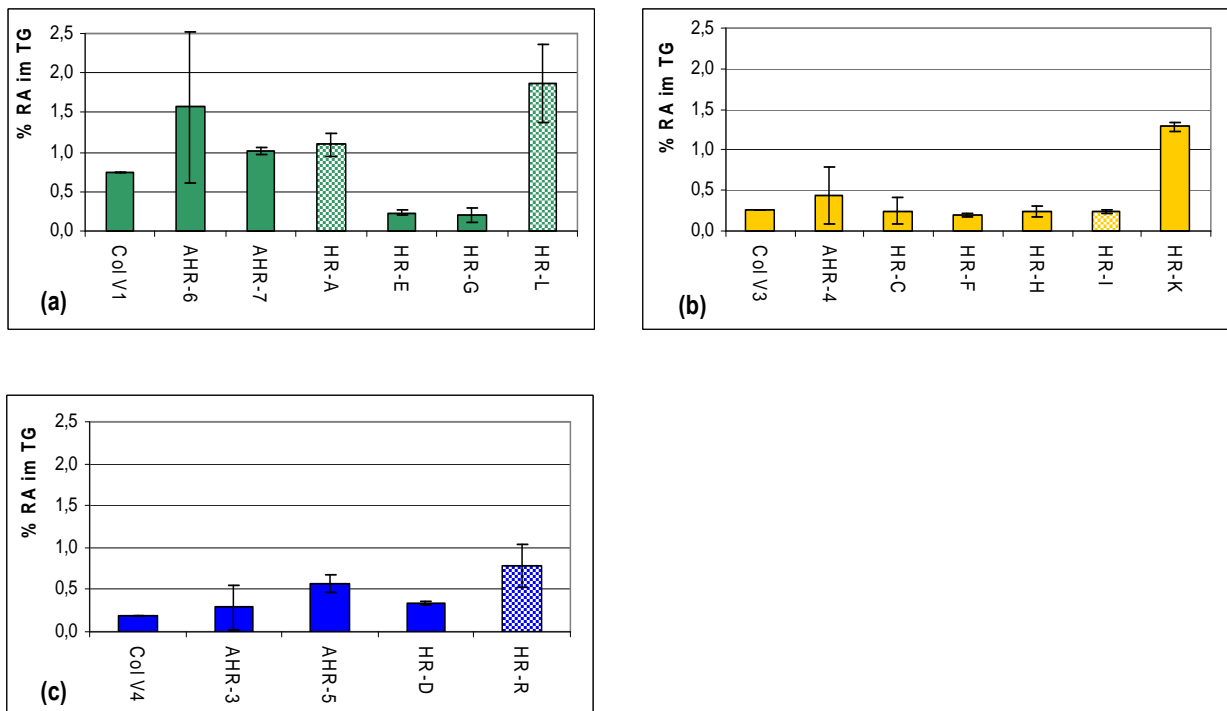


Abb. 4.14.: Rosmarinsäuregehalte der verschiedenen Hairy Root-Linien. Abkömmlinge der *Coleus blumei*-Linie Col V1 sind in grün (a), Col V3 in gelb (b) und Col V4 in blau (c) dargestellt. Die Bezeichnung Col Vx steht für den Rosmarinsäuregehalt der entsprechenden Sprosskultur. Die RNAi-Linien, die positiv für HPPR in der semiquantitativen PCR waren (Abb. 4.13.) sind kariert dargestellt. Bis auf HR-K und HR-L stammen alle HPPR-RNAi-Linien von LBA 15834 ab, während die beiden genannten Kulturen aus TR105 hervorgingen. AHR-1, AHR-3 und AHR-7 stammen von LBA 15834, AHR-2 von TR 105, AHR-4, -5 und -6 von LBA 9402 (vgl. Tabelle 4.1.). AHR-x („Wildtyp“-Transformationen); HR-x (HPPR-RNAi-Transformationen).

4.3. RNAi und Überexpression von HPPR und RAS

4.3.1. Transformationsraten und erhaltene stabile Kulturen für RNAi, Überexpression und Kontrollen

Aufgrund der in Kapitel 4.2. beschriebenen Ergebnisse wurde die Kombination ColV1 und LBA15834 für die folgenden Transformationen gewählt. Als Kontrolle wurden Blätter mit untransformierten Agrobakterien und Agrobakterien mit leerem pART27 Vektor infiziert. Zum besseren Verständnis der Rosmarinsäurebiosynthese und der daran beteiligten Enzyme

wurden von HPPR und RAS sowohl RNAi- als auch Überexpressionskonstrukte durch Agrobakterien in die Pflanzen eingebracht. Die Transformationsraten sind in der Tabelle 4.3. aufgeführt. Die Transformationsraten beziehen sich auf die überlebenden, auf Kanamycin selektierten Wurzeln und die in Flüssigkultur angelegten Wurzeln. Die Transformationsraten in Klammern beziehen sich auf die insgesamt geernteten Hairy Roots und die daraus resultierenden, stabilen Flüssigkulturen. Die Hairy Root-Linien in stabiler Kultur wurden molekularbiologisch untersucht und für Versuche als adäquat erachtet, da sie frei von Agrobakterien und positiv für das eingebrachte Konstrukt waren und bei der semiquantitativen RT-PCR meist die erwartete Transkript-Menge aufwiesen.

Transformationen und Kulturbezeichnungen	Anzahl der gewonnenen Hairy Roots	Transformationsrate
Ohne Konstrukt (LBA)	10 Hairy Roots geerntet, 8 kanamycinresistent, 6 in stabiler Kultur	75,0% (60,0%)
Vektor pART27 (pART) ohne Fremd-DNA	37 Hairy Roots geerntet, 11 kanamycinresistent, 5 in stabiler Kultur	45,4% (13,5%)
HPPR RNAi (HPPR RNAi)	22 Hairy Roots geerntet, 20 kanamycinresistent, 5 in stabiler Kultur	25,5% (22,7%)
Überexpression HPPR (35S HPPR)	26 Hairy Roots geerntet, 8 kanamycinresistent, 3 in stabiler Kultur	37,5% (11,5%)
RAS RNAi (RAS RNAi)	23 Hairy Roots geerntet, 12 kanamycinresistent, 5 in stabiler Kultur	41,7% (21,7%)
Überexpression RAS (35S RAS)	14 Hairy Roots geerntet, 7 kanamycinresistent, 5 in stabiler Kultur	71,4% (35,7%)

Tabelle 4.3.: Tabelle der durchgeführten Transformationen und deren Transformationsraten. Die Transformationsraten beziehen sich auf die überlebenden, auf Kanamycin selektierten Wurzeln und die in Flüssigkultur angelegten Wurzeln. Die Transformationsraten in Klammern beziehen sich auf die insgesamt geernteten Hairy Roots und die daraus resultierenden, stabilen Flüssigkulturen.

4.3.2. Molekularbiologische Untersuchungen der RNAi- und Überexpressions-Hairy Roots und deren Kontrollen

Die Hairy Root-Kulturen wurden molekularbiologisch auf ihre Tauglichkeit für Experimente überprüft. Dazu wurde wieder die Abwesenheit von Agrobakterien durch PCR mit *virC*-Primern getestet. Eine erfolgreiche Transformation wurde durch 35S-Primer und zusätzlich durch *nptII*-Primer (Kanamycin-Resistenzgen) bestätigt. Zusätzlich wurden die durch Agrobakterien transformierten Hairy Roots auf die Anwesenheit der *rol*-Gene überprüft. Die

Auswirkungen der Transformationen auf die Expression der entsprechenden Gene wurde durch semiquantitative PCR auf cDNA mit den entsprechenden Vollängen-Primern kontrolliert. Um die Anzahl der Transformationsereignisse abschätzen zu können, wurden Southern Blots durchgeführt. Es wurden Sonden für den 35S-Promotor aus der Expressionskassette von pHANNIBAL und das *nptII*-Gen auf dem pART27-Vektor verwendet.

4.3.2.1. Test auf Anwesenheit der RNAi- und Überexpressionskonstrukte mit 35S-Primern

Zur Kontrolle, ob die gewünschten RNAi- oder Überexpressions-T-DNAs tatsächlich in das pflanzliche Genom integriert wurden, wurde erst eine PCR mit 35S-Primern auf genomischer DNA der einzelnen Hairy Root-Linien durchgeführt. Dabei wurde ein Teil des konstitutiven Promotors der pHANNIBAL-Expressionskassette amplifiziert. Das Fragment ist etwa 700 bp lang. In Abb. 4.15. ist zu sehen, dass bei LBA- und pART-Linien kein Produkt zu sehen ist, da bei beiden die pHANNIBAL-Expressionskassette fehlt. Die RNAi- und Überexpressionslinien hingegen weisen alle ein PCR-Produkt entsprechender Größe auf.

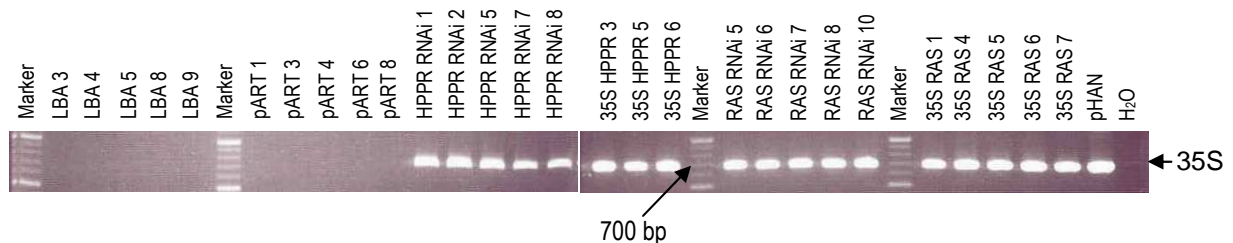


Abb. 4.15.: PCR auf genomischer DNA mit 35S-Primern zum Nachweis der pHANNIBAL-Expressionskassette.

4.3.2.2. Test auf Anwesenheit der RNAi- und Überexpressionskonstrukte mit *nptII*-Primern

Zusätzlich zu der PCR mit den 35S-Primern wurde die Anwesenheit des *nptII*-Gens aus der T-DNA des pART27-Vektors durch PCR nachgewiesen. Dies erfasst auch die Transformanten, die nur mit leerem pART27-Vektor transformiert wurden. In Abb. 4.16. sind alle Transformanten positiv für das 700 bp große *nptII*-Genfragment bis auf die Hairy Root-Linien ohne pART27-Vektor.

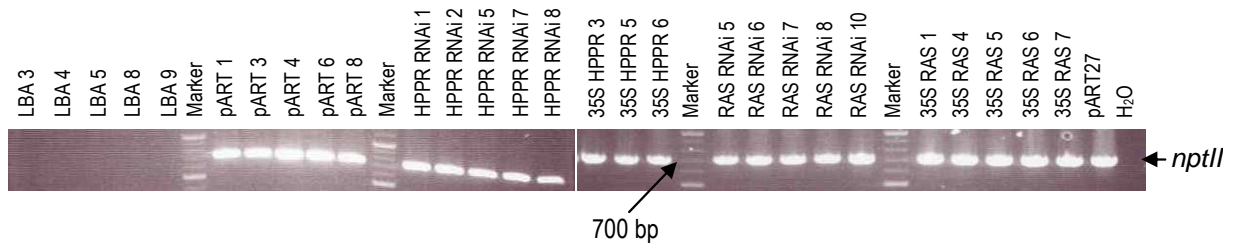


Abb. 4.16.: PCR auf genomischer DNA mit *nptII*-Primern zum Nachweis des *nptII*-Gens aus der T-DNA des pART27-Vektors.

4.3.2.3. Test auf die Abwesenheit von Agrobakterien

Um die Kulturen auf Abwesenheit von *Agrobacterium rhizogenes* zu überprüfen, wurde eine PCR auf das Agrobakteriengen *virC* durchgeführt. Abb. 4.17. zeigt, dass in den Hairy Root-Linien kein *virC*-Gen-Fragment von etwa 700 bp amplifiziert wurde. Nur die Positiv-Kontrolle mit Agrobakterien-DNA von LBA15834 zeigt die erwartete *virC*-Bande.

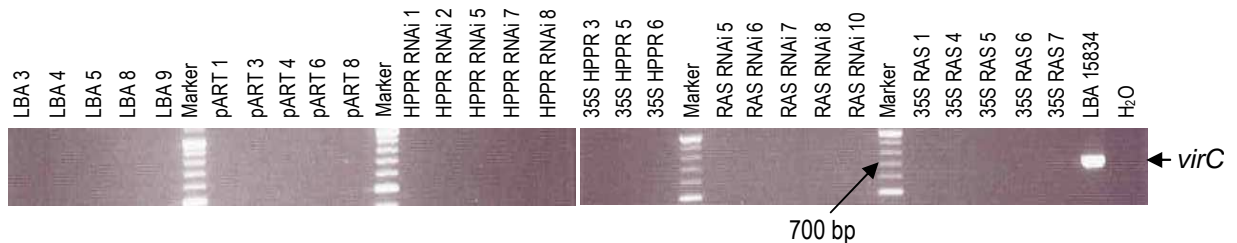


Abb. 4.17.: PCR auf genomischer DNA mit *virC*-Primern zur Überprüfung der Abwesenheit von *Agrobacterium rhizogenes* in den Hairy Root-Kulturen.

4.3.2.4. Test auf agrobakterienbedingte Transformation

Da die übertragenen *rol*-Gene der Agrobakterien Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel haben können (Bulgakov et al., 2005; Bonhomme et al., 1999), wurden die Kulturen auf die Anwesenheit von *rolA* (200 bp PCR-Produkt), *rolB* (650 bp PCR-Produkt) und *rolC* (450 bp PCR-Produkt) überprüft. Alle Hairy Root-Linien tragen gleichermaßen die drei *rol*-Gene (siehe Abb. 4.18.).

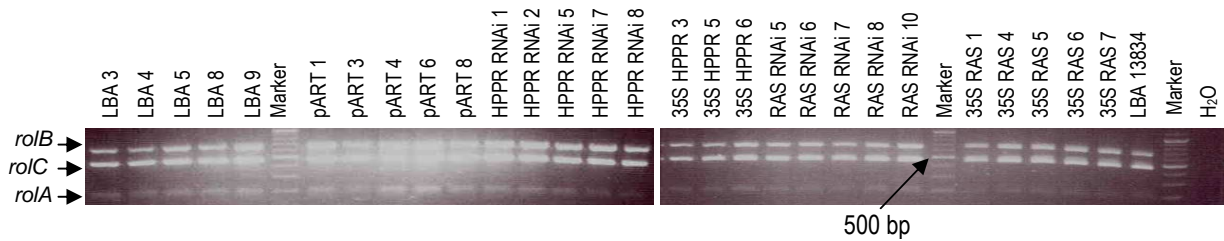


Abb. 4.18.: Triplex-PCR auf genomischer DNA mit *rolA*, *rolB*, *rolC*-Primern.

4.3.2.5. Bestimmung der mRNA-Level von RAS, HPPR und HPR1

Um die Hairy Root-Linien auf ihre Eignung in Bezug auf die Funktion der eingeführten RNAi- bzw. Überexpressionskonstrukte zu untersuchen, wurden die mRNA-Level der Pflanzengene HPPR und RAS durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Es wurden Duplex-PCRs von 28 Zyklen mit dem internen Standard Aktin durchgeführt. Die HPPR-Volllänge ist etwa 950 bp lang, das Aktin-Fragment etwa 150 bp. Für HPPR zeigten die Linien LBA, pART, RAS RNAi und 35S RAS etwa gleiche Mengen an HPPR-Produkt. Bei den HPPR-RNAi-Linien ist bei den Kulturen 1, 2 und 5 etwas weniger Produkt zu beobachten, bei den Kulturen 7 und 8 ist kein Produkt zu sehen, gleichbedeutend mit einem vollständigen Abbau der HPPR-mRNA. Die Überexpressionslinien 35S HPPR 3 und 5 zeigen deutlich mehr Produkt als alle anderen Linien, wohingegen 35S HPPR 6 nur wenig HPPR-Produkt aufweist (siehe Abb. 4.19.).

Für RAS war nach 28 PCR-Zyklen kein Produkt sichtbar. Aus diesem Grund wurde die Zyklenzahl auf 36 erhöht, um eine Aussage über den RAS-mRNA-Gehalt machen zu können. Die Menge an RAS-mRNA ist in den LBA- und pART-Linien etwa gleich. In den HPPR-RNAi- und 35S HPPR-Linien scheint etwas mehr Produkt vorhanden zu sein. Bis auf Kultur 8 zeigen die RAS RNAi-Linien kein Produkt. Die Überexpressionslinien 35S RAS zeigen eine mit den LBA-Linien vergleichbare Mengen an RAS-mRNA, teils auch weniger (siehe Abb. 4.20.).

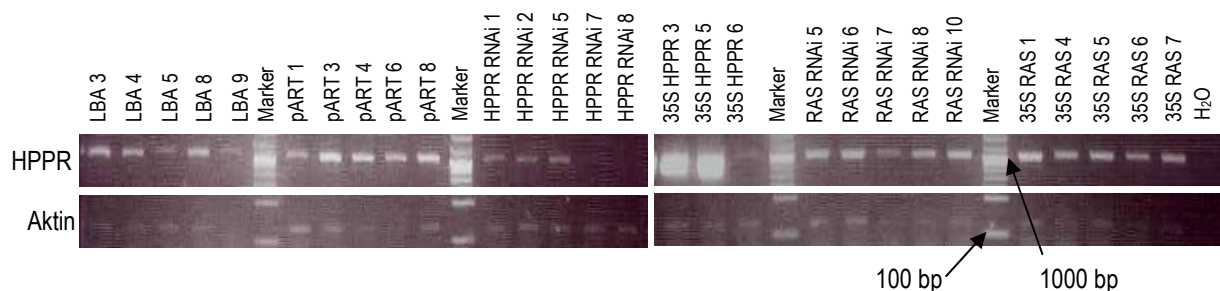


Abb. 4.19.: Semiquantitative RT-PCR mit HPPR- und Aktin-Primern.

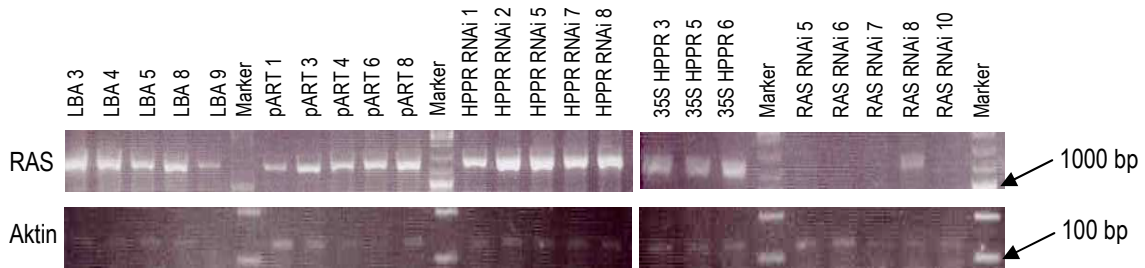


Abb. 4.20.: Semiquantitative RT-PCR mit RAS-Primern (36 Zyklen) und Aktin-Primern (28 Zyklen).

Aufgrund der Ähnlichkeit der katalysierten Reaktion der HPR1 und HPPr wurde ebenfalls eine semiquantitative PCR mit HPR1- und Aktin-Primern durchgeführt. Dies diente dazu abzuschätzen, ob die Anwesenheit von *hpr1*-Transkripten und damit des entsprechenden Enzymproteins einen Einfluss auf die Enzymtests mit Enzymrohextrakten aus Wurzelmaterial haben könnte. Es wurde angenommen, dass HPR1 kaum exprimiert wird, da es sich bei der Kultur physiologisch um Wurzeln handelt, die im Dunkeln kultiviert werden, die HPR1 aber ein Enzym der Photorespiration ist. Ähnlich wie bei RAS ist nach 29 Zyklen kein Produkt der *hpr1* zu sehen (Abb. 4.21.). Daher wurde erneut eine PCR mit 40 Zyklen durchgeführt. Es ist in allen Kulturen eine geringe Menge an *hpr1*-Amplifikat zu sehen (Abb. 4.22.). Als positive Kontrolle wurde cDNA aus *Coleus blumei*-Blättern verwendet, die eine deutlich größere Menge an *hpr1*-Amplifikat zeigt.

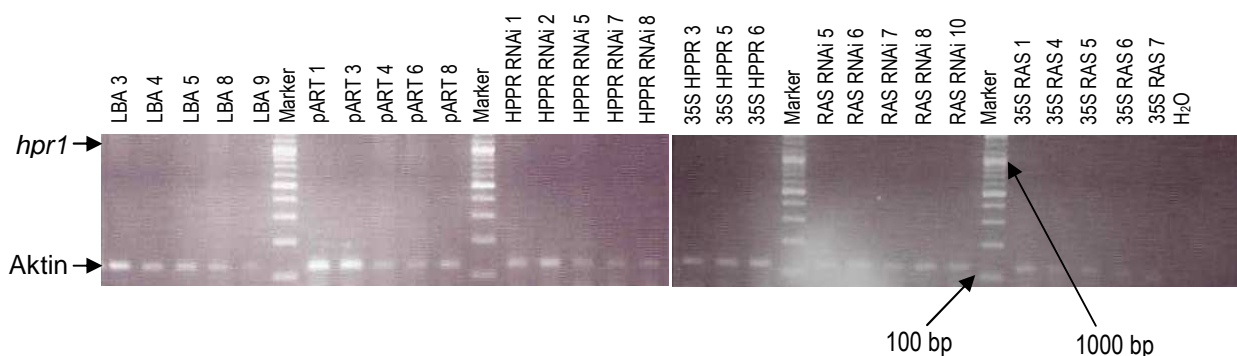


Abb. 4.21.: Semiquantitative RT-PCR mit Aktin- und *hpr1*-Primern (29 Zyklen).

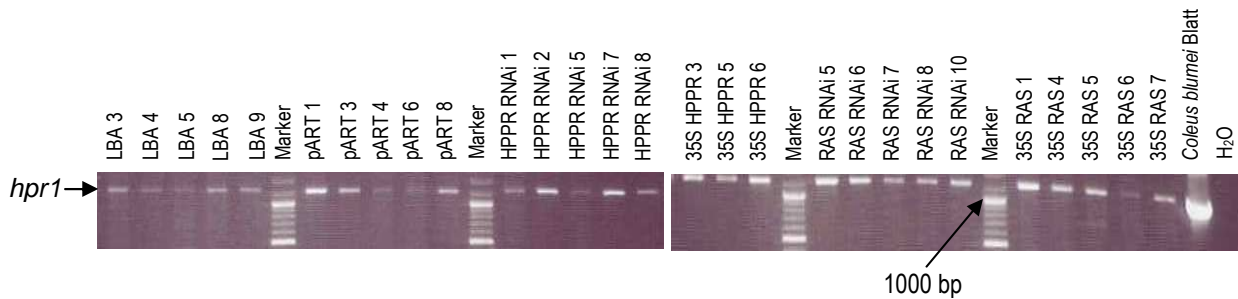


Abb. 4.22.: Semiquantitative RT-PCR mit *hpr1*-Primern (40 Zyklen).

4.3.2.6. Bestimmung der Transformationsereignisse durch Southern Blot

Zur Abschätzung der Kopienzahl der ins Pflanzengenom integrierten RNAi- und Überexpressionskonstrukte für HPPR und RAS wurden Southern Blots mit zwei verschiedenen Sonden durchgeführt. Einmal wurden die 35S-Primer zur Sondenherstellung über PCR verwendet. Damit wird der 35S-Promotor der pHANNIBAL-Expressionskassette detektiert. Für die zweite Sonde fanden die *nptII*-Primer Verwendung. Damit wurde das *nptII*-Gen der T-DNA aus dem pART27-Vektor detektiert. Die genomische DNA der Hairy Roots wurde mit *EcoRI* verdaut und dann jeweils ein Blot mit der 35S-Sonde und ein Blot mit der *nptII*-Sonde hybridisiert. Da *EcoRI* beide Sondenbereiche nicht schneidet, sollte die Anzahl der auf dem Blot sichtbaren Banden bei beiden Sonden gleich sein. Der Vergleich der beiden Blots lieferte Hinweise auf die Anzahl der integrierten Konstrukte (Abb. 4.23.). Bei allen Konstrukten ist zu beobachten, dass mehrere Kopien in das Pflanzengenom integriert wurden. Die abgeschätzte Anzahl der Transformationsereignisse ist in der Tabelle 4.4. aufgeführt.

Hairy Root-Linie	Anzahl der Transformationsereignisse	Hairy Root-Linie	Anzahl der Transformationsereignisse
pART 1	4	RAS RNAi 5	3-4
pART 3	2	RAS RNAi 6	4
pART 4	6	RAS RNAi 7	4-5
pART 6	3	RAS RNAi 8	6
pART 8	2	RAS RNAi 10	2-6
HPPR RNAi 1	8	35S RAS 1	3
HPPR RNAi 2	8	35S RAS 4	3-4
HPPR RNAi 5	8	35S RAS 5	4
HPPR RNAi 7	2	35S RAS 6	3
HPPR RNAi 8	3	35S RAS 7	5
35S HPPR 3	7-8		
35S HPPR 5	5-7		
35S HPPR 6	6-12		

Tabelle 4.4.: Auflistung der abgeschätzten Anzahl der Transformationsereignisse in den konstrukttragenden Hairy Root-Linien.

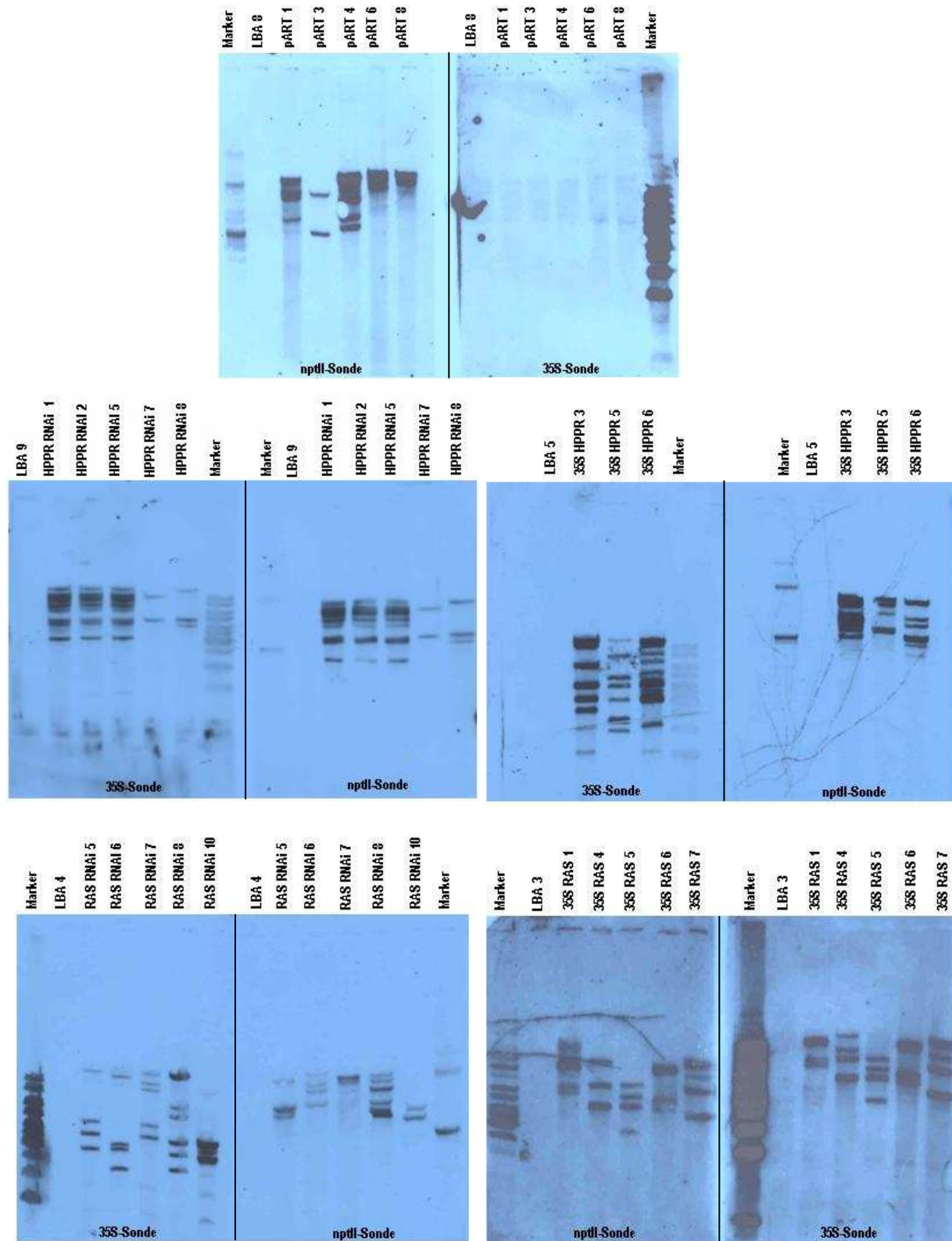


Abb. 4.23.: Southern Blots der transgenen Hairy Root-Linien. LBA-Linien dienten jeweils als Negativkontrolle. Die DNA wurde mit *Eco*RI verdaut und mit den zwei Sonden 35S und nptII hybridisiert.

4.3.3. Kulturcharakterisierung einzelner Hairy Root-Linien

Um einen Erntezeitpunkt für detailliertere Untersuchungen an den verschiedenen Hairy Root-Linien zu bestimmen, wurde eine kurze Kulturcharakterisierung über 15 Tage durchgeführt und jeden dritten Tag Wurzelmaterial geerntet. Es wurde jeweils eine Kultur der verschiedenen Transformationen vermessen, um eventuelle Unterschiede im Kulturverlauf beobachten zu können. Es wurden der pH-Wert (Abb. 4.24.), die Leitfähigkeit (Abb. 4.25.) und der Zuckergehalt (Abb. 4.26.) des Mediums zum Erntezeitpunkt festgehalten. Das Frischgewicht (Abb. 4.27.) und der Rosmarinsäure-Gehalt (Abb. 4.28.) wurden bestimmt. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Enzyme PAL (Abb. 4.29.), TAT (Abb. 4.30.) und RAS (Abb. 4.31.) gemessen. Da für HPPR-Messungen nicht genug Enzymrohextrakt gewonnen werden konnte, wurde für die Enzyme HPPR und RAS mit der Kultur LBA 8 eine kurze Kulturcharakterisierung angesetzt und eine semiquantitative RT-PCR mit den Vollängen-Primern von RAS und HPPR für die Tage 7, 9, 11, 13 und 15 durchgeführt (Abb. 4.32.).

4.3.3.1. Beobachtung der Medienparameter

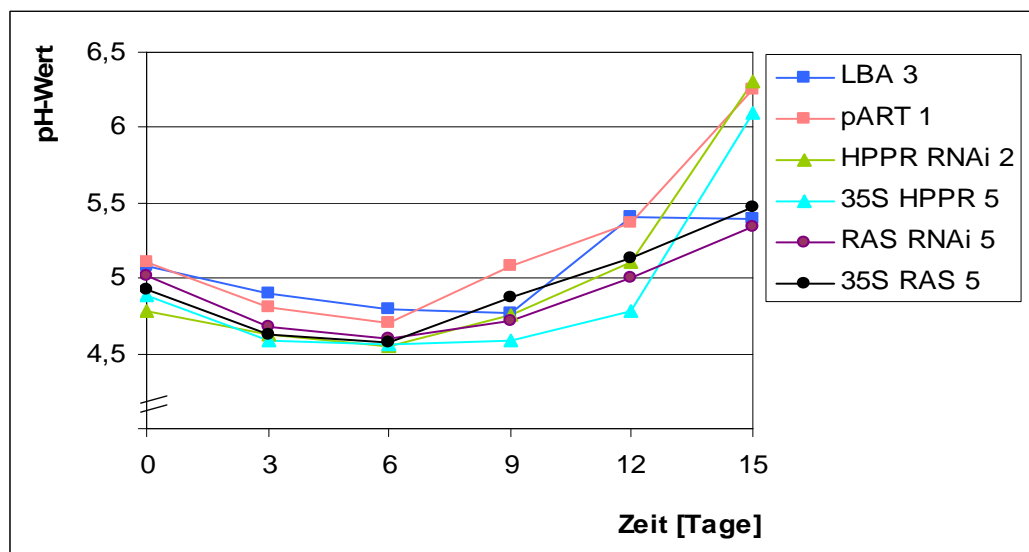


Abb. 4.24.: pH-Werte des Mediums zum Erntezeitpunkt.

Die Medienparameter verhielten sich bei allen Kulturen annähernd gleich. Der pH-Wert fällt während der Kulturzeit von ca. pH 5 erst leicht auf etwa pH 4,5 am sechsten Kulturtag ab und steigt dann schnell bis auf etwa pH 6,5. Bei der Linie LBA3 und den RAS-RNAi- und Überexpressionslinien fällt dieser Anstieg deutlich geringer aus (Abb. 4.24.).

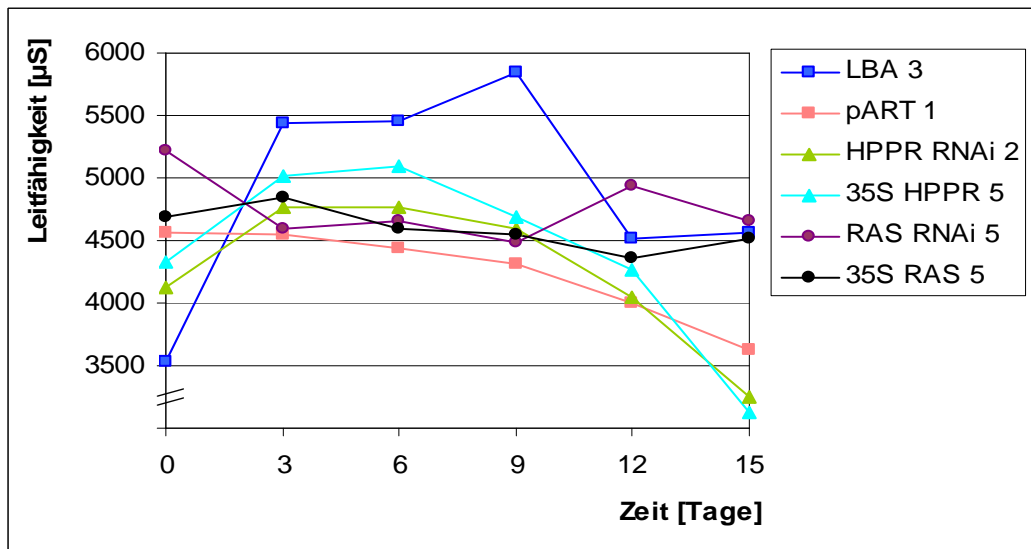


Abb. 4.25.: Leitfähigkeit des Mediums zum Erntezeitpunkt.

Linie LBA 3 zeigt einen starken Anstieg der Leitfähigkeit des Mediums von 3500 μS auf fast 6000 μS am neunten Kulturtag, um dann wieder auf etwa 4500 μS abzufallen. pART 1 hingegen zeigt einen leichten Abfall von 4500 μS auf 3500 μS über den Zeitraum von fünfzehn Kulturtagen. Die HPPR RNAi 2 und 35S HPPR 5 zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, am ersten Kulturtag liegen sie bei etwa 4200 μS , dann steigt die Leitfähigkeit bis zum sechsten Tag auf etwa 5000 μS an und fällt dann bis zum fünfzehnten Kulturtag auf fast 3000 μS ab. Die Linien RAS RNAi 5 und 35S RAS 5 zeigen leichte Schwankungen während der Kulturperiode und weisen nur einen leichten Abfall von etwa 5200 bzw. 4700 μS auf etwa 4500 μS auf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Leitfähigkeit am Kulturbeginn bei etwa 4500 μS beginnt, meist bis etwa 5000 am sechsten Kulturtag steigt und dann wieder leicht auf etwa 4000 μS abfällt (Abb. 4.25.).

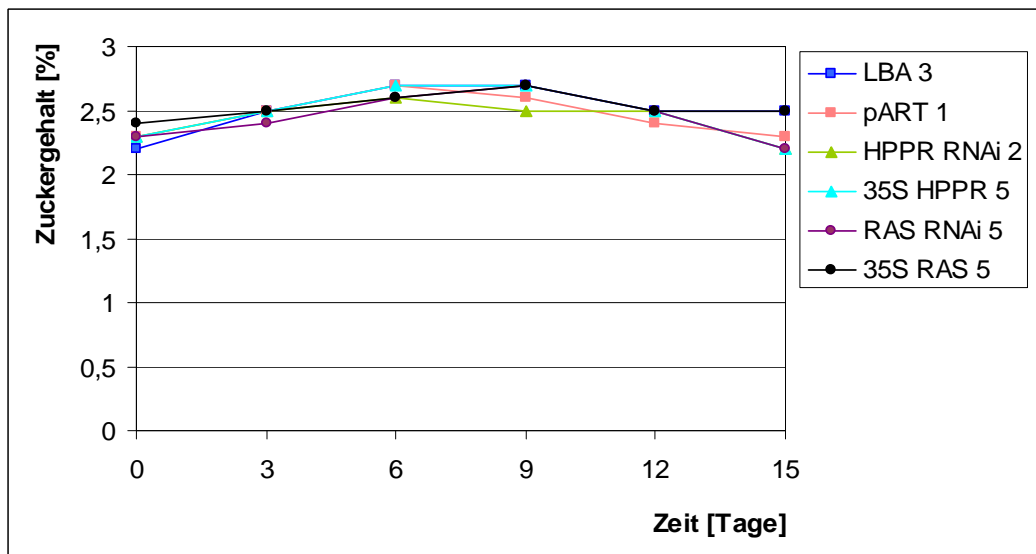


Abb. 4.26.: Zuckergehalt des Mediums zum Erntezeitpunkt.

Der Zuckergehalt liegt über den gesamten Kulturverlauf im Bereich von 2,2 bis 2,5 %. Auffallend ist ein leichter Anstieg bis zum sechsten bzw. neunten Kulturtag (4.26.). Der Zuckergehalt des Mediums wurde durch den Brechungsindex mit einem Refraktometer bestimmt. Der leichte, gemessene Anstieg des Zuckergehalts könnte von Substanzen verursacht werden, die von den Wurzeln ins Medium abgegeben wurden und die Messungen beeinflussen.

4.3.3.2. Bestimmung von Frisch- und Trockengewichten

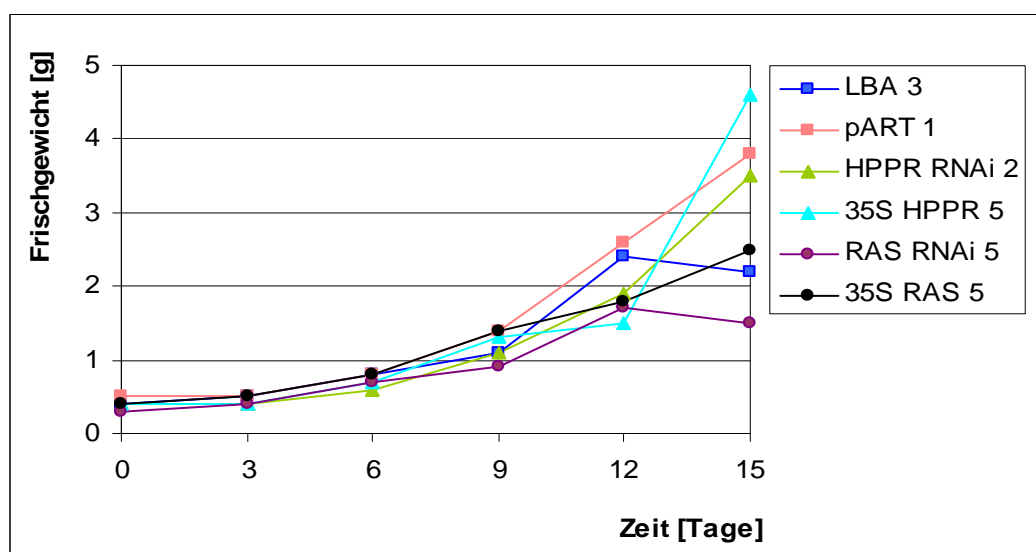


Abb. 4.27.: Frischgewichte pro Kolben in den verschiedenen Hairy Root-Kulturen.

Die Zunahme der Frischgewichte in den einzelnen Linien ist bis zum neunten Tag annähernd parallel. Anschließend nehmen die Frischgewichte schnell, aber in den einzelnen Linien unterschiedlich stark zu (Abb. 4.27.). Bei der Bestimmung der Trockengewichte konnte festgestellt werden, dass sich der Wassergehalt sich während Kulturperiode nicht wesentlich ändert.

4.3.3.3. Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts

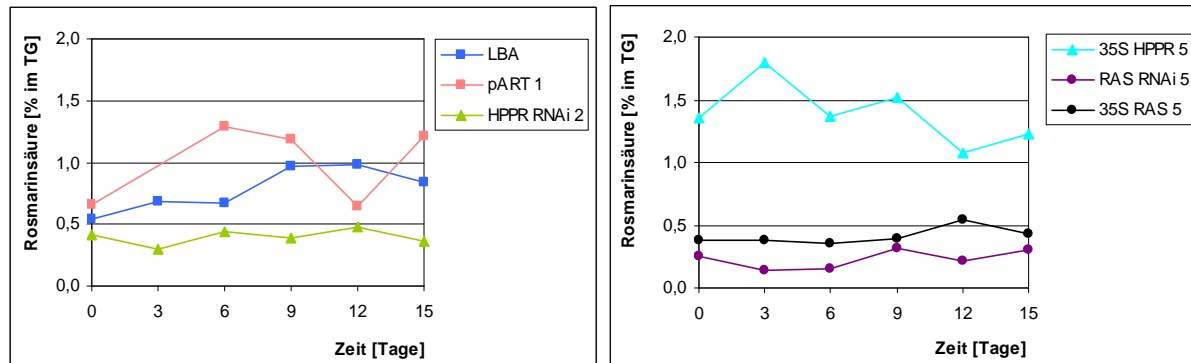


Abb. 4.28.: Rosmarinsäure-Akkumulation in den einzelnen Hairy Root-Linien während des Kulturverlaufs.

Die Rosmarinsäuregehalte zeigen fast konstante Level über den Kulturzeitraum und steigen ab Tag sechs bis neun nur leicht auf etwa 1% an. Vor allem bei den RNAi- und Überexpressionslinien findet kaum eine Zunahme statt. Über den gesamten Kulturverlauf liegt der Rosmarinsäuregehalt der HPPR-Überexpressionslinien deutlich über den Werten der anderen Linien. Die Linien HPPR RNAi, RAS RNAi und 35S RAS weisen nur einen Rosmarinsäuregehalt von unter 0,5% des Trockengewichts auf (Abb. 4.28.).

4.3.3.4. Enzymaktivitäten von PAL, TAT und RAS

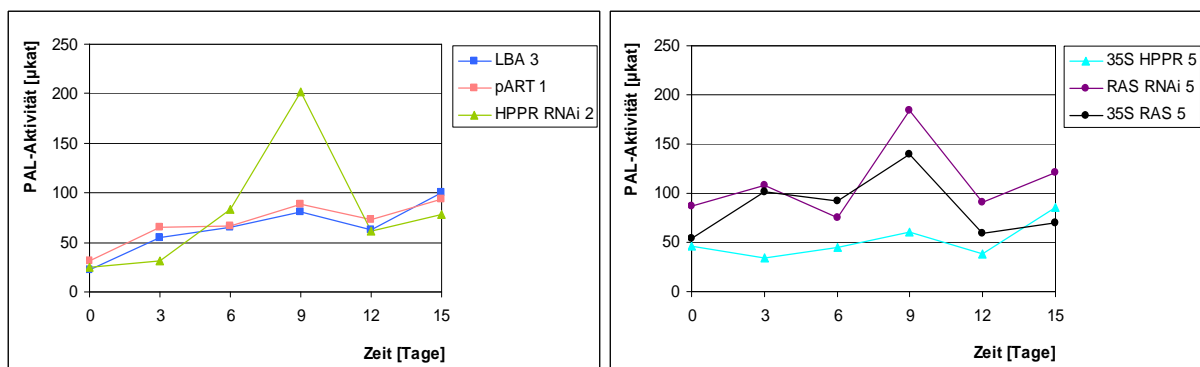


Abb. 4.29.: Verlauf der Enzymaktivität der PAL in Enzymrohextrakten aus den verschiedenen Hairy Root-Linien.

Die PAL-Aktivität erreicht an Tag neun ein Maximum. In den Linien HPPR RNAi, RAS RNAi und 35S RAS liegt dieses Maximum deutlich höher als in den anderen Kulturen (Abb. 4.29.).

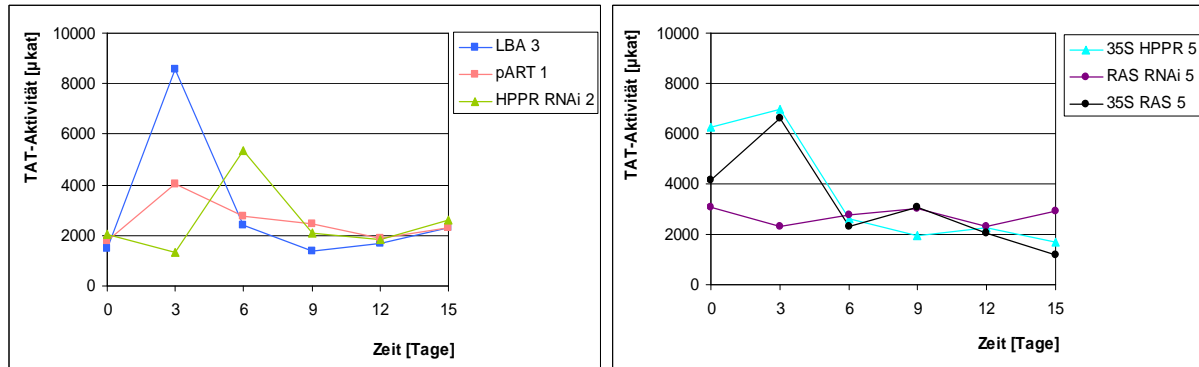


Abb. 4.30.: Verlauf der Enzymaktivität der TAT in Enzymrohextrakten aus den verschiedenen Hairy Root-Linien.

Die Aktivität der TAT erreicht bereits an Tag drei bis sechs ihren Höhepunkt. Die Kulturen LBA, 35S HPPR und 35S RAS zeigen während dieser Zeit die höchsten Aktivitäten (Abb. 4.30.).

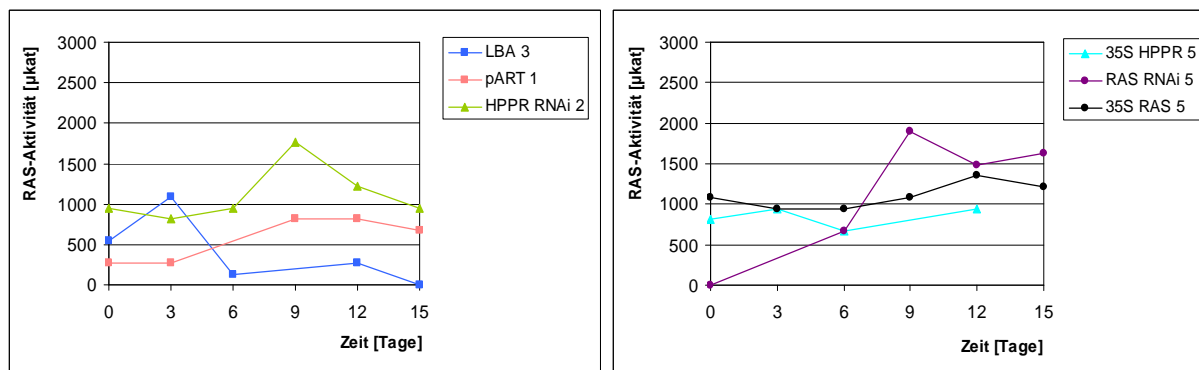


Abb. 4.31.: Verlauf der Enzymaktivität der RAS in Enzymrohextrakten aus den verschiedenen Hairy Root-Linien.

Die RAS zeigt in den meisten Hairy Root-Kulturen an Tag neun bis zwölf ihre höchste Aktivität (Abb. 4.31.).

Dieser Verlauf wird für den Kulturverlauf der Linie LBA 8 durch semiquantitative RT-PCR bestätigt (Abb. 4.32.).

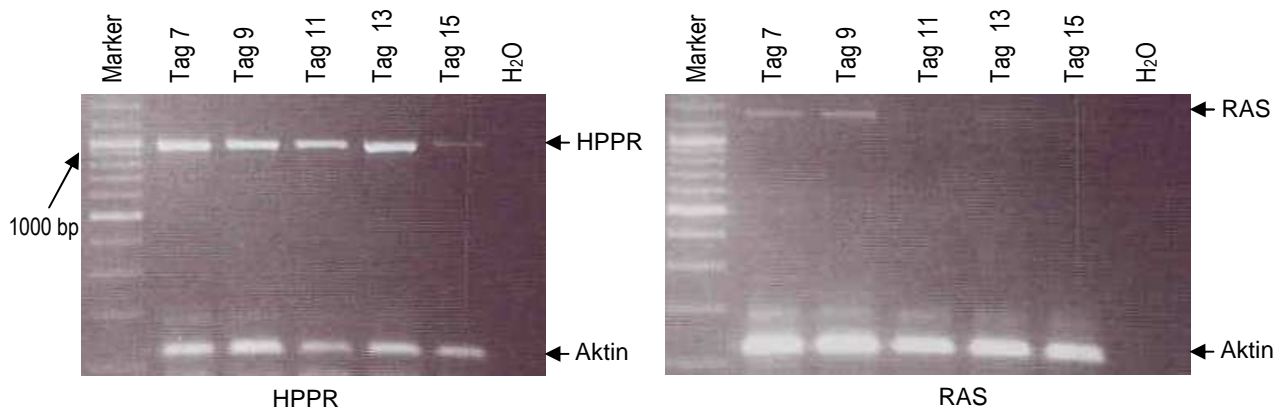
4.3.3.5. Bestimmung der m-RNA-Level von HPPR und RAS während der Kulturperiode

Abb. 4.32.: Semiquantitative RT-PCR der Zeitreihe von LBA 8. Es wurden RAS und HPPR amplifiziert, als interner Standard diente Aktin.

Für die Linie LBA 8 wurde für den Zeitraum von Tag sieben bis Tag fünfzehn Material für eine semiquantitative RT-PCR geerntet. Es wurden HPPR und RAS in Volllänge amplifiziert, als interner Standard diente Aktin. Die RAS zeigt während der Kulturtage sieben und neun die meiste Transkript-Menge, dies deckt sich mit der RAS-Aktivität des Enzymrohextraktes, die an den Tagen neun bis zwölf ihren Höhepunkt erreicht (vgl. Abb. 4.31. und 4.32.).

Die HPPR zeigt in der semiquantitativen RT-PCR über den Zeitraum von Tag sieben bis Tag 13 etwa gleich bleibende Transkriptmengen (Abb. 4.32.).

4.3.4. Untersuchung der transgenen Hairy Root-Linien im Vergleich

Zur Untersuchung der verschiedenen Hairy Root-Linien wurden die Kulturen aufgrund der Charakterisierungsergebnisse am zwölften Kulturtag geerntet. Es wurde der Rosmarinsäuregehalt (Abb. 4.33. und 4.34.) bestimmt und die spezifischen Aktivitäten der Enzyme TAT (Abb. 4.35. und 4.36.), PAL (Abb. 4.37. und 4.38.), HPPR (Abb. 4.39. und 4.40.) und RAS (Abb. 4.41. und 4.42.) ermittelt.

4.3.4.1. Rosmarinsäuregehalte

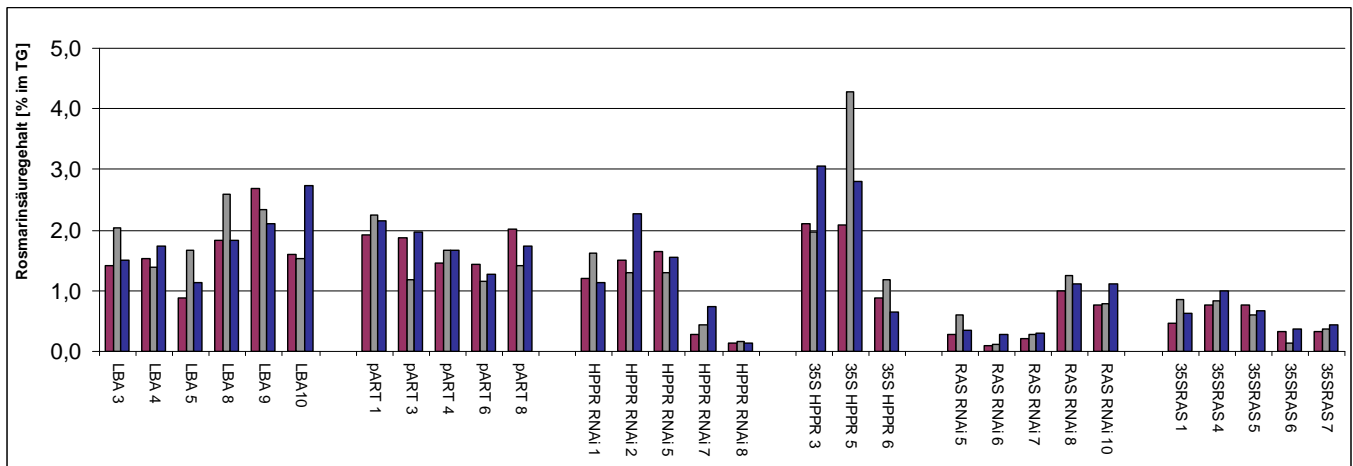


Abb. 4.33.: Rosmarinsäuregehalt bezogen auf das Trockengewicht in Wurzelmaterial aus drei verschiedenen Ernten (Ernte 3, 6 und 7).

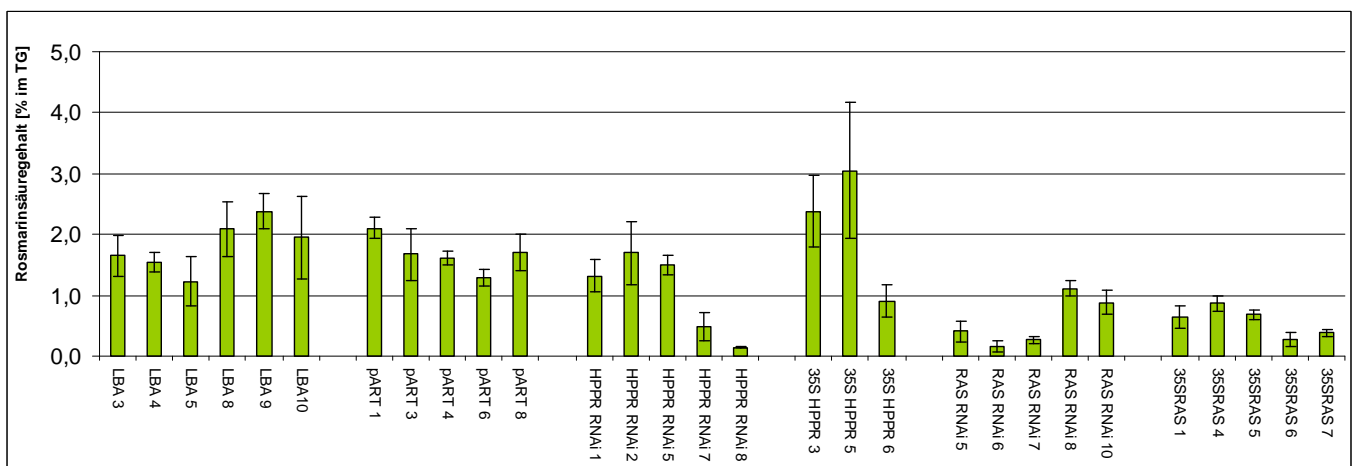


Abb. 4.34.: Gemittelte Werte der Rosmarinsäuregehalte aus Abb. 4.33. mit Standardabweichungen.

Der Rosmarinsäuregehalt der nicht transformierten bzw. nur mit leerem pART27-Vektor transformierten Hairy Root-Linien liegen vergleichbar bei etwa 1,5 bis 2,0 % Rosmarinsäure im Trockengewicht. Die höchsten Werte liegen bei etwa 2,5 %, die niedrigsten bei etwa 1,2 %. Ebenso zeigen die HPPR RNAi-Linien 1, 2 und 5 einen Gehalt von mehr als 1 %, mit dem höchsten Wert von 1,5 % Rosmarinsäure. Die HPPR RNAi-Linien 7 und 8 zeigen einen Gehalt von deutlich unter 0,5 %, der niedrigste Wert liegt bei 0,2 %. Die 35S HPPR-Linien 3 und 5 erreichen Werte von über 2 % bis 3 % Rosmarinsäure, die Linie 6 hingegen nur knapp 1 %. Die RAS RNAi-Linien und die 35S RAS-Linien zeigen Rosmarinsäuregehalte von unter 1%. Die RAS RNAi-Linien 5, 6 und 7, sowie die 35S RAS-Linien 6 und 7 sogar unter 0,5 %, mit den niedrigsten Werten bei 0,2 % Rosmarinsäure (Abb. 4.33. und 4.34.).

4.3.4.2. TAT-Aktivität

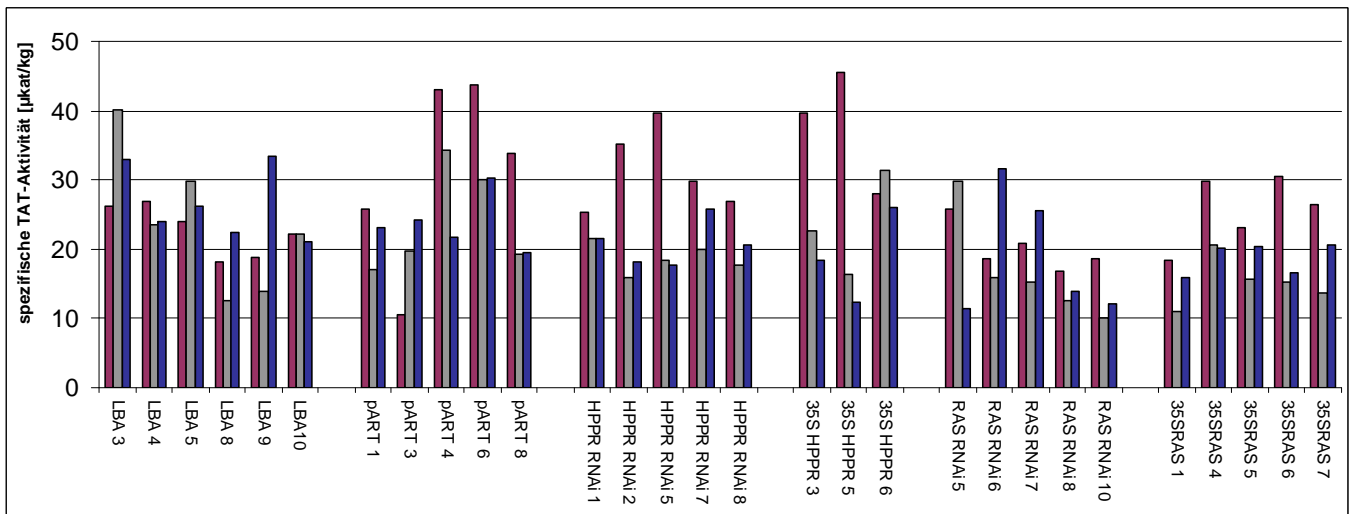


Abb. 4.35.: Spezifische TAT-Aktivität gemessen in Proteinextrakten aus Hairy Root-Kulturen aus drei verschiedenen Ernten (Ernte 5, 8 und 9).

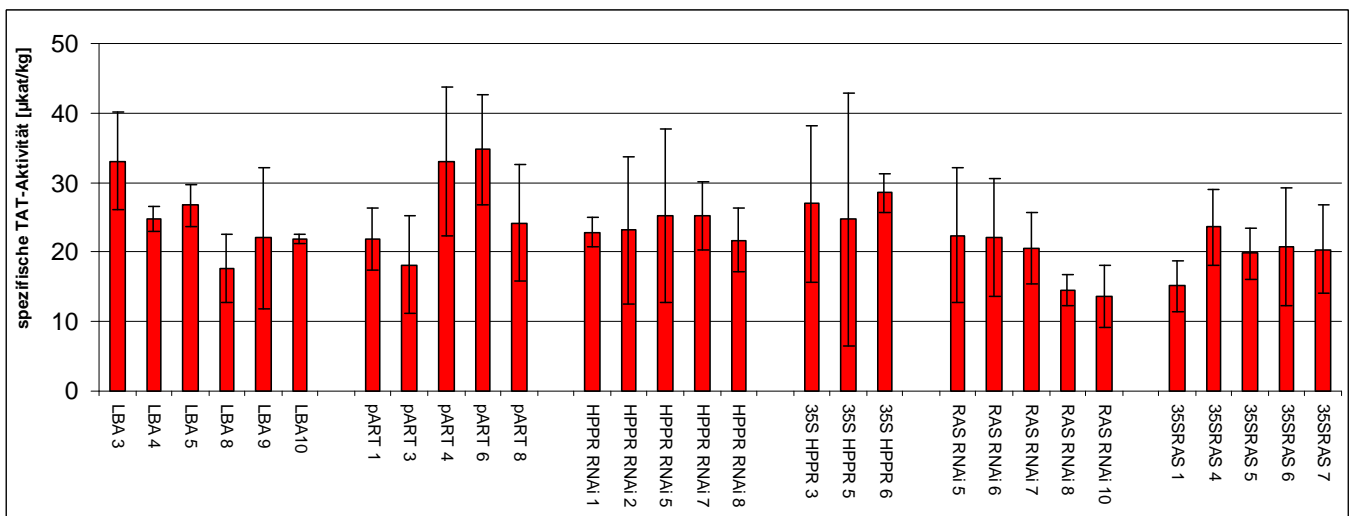


Abb. 4.36.: Gemittelte Werte der spezifischen TAT-Aktivität aus Abb. 4.35. mit Standardabweichungen.

Die TAT ist eines der beiden Eingangsenzyme der Rosmarinsäurebiosynthese. Die Aktivitätswerte der TAT variieren von Werten um 15 µkat/kg bis 35 µkat/kg, doch bewegen sie sich im Mittel bei allen Linien um die 20 µkat/kg (Abb. 4.35. und 4.36.).

4.3.4.3. PAL-Aktivität

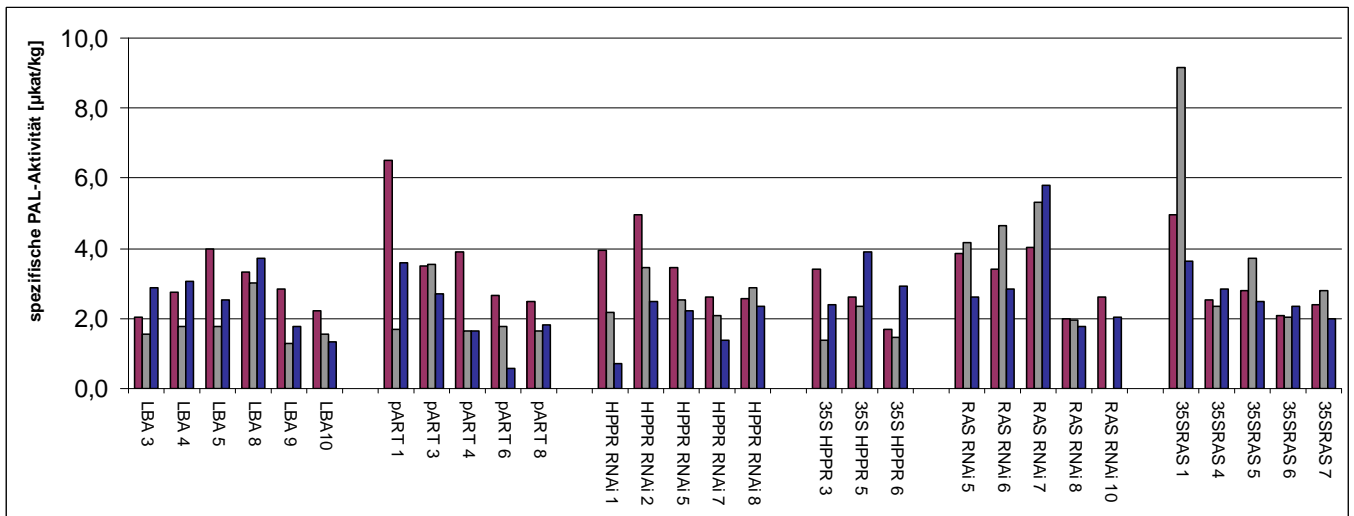


Abb. 4.37.: Spezifische PAL-Aktivität in Enzymextrakten aus Hairy Root-Kulturen aus drei verschiedenen Ernten (Ernte 1, 3 und 6).

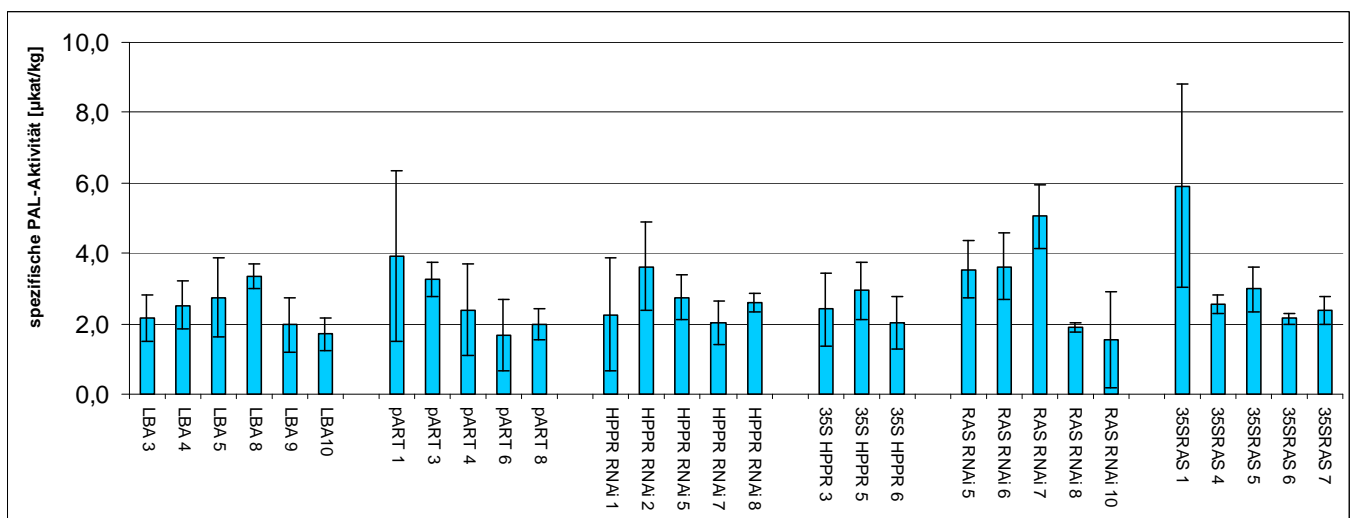


Abb. 4.38.: Gemittelte Werte der spezifischen PAL-Aktivität aus Abb. 4.37. mit Standardabweichungen.

Die PAL ist ebenfalls ein Eingangsenzym der Rosmarinsäurebiosynthese, und ihre Aktivität korreliert mit der Rosmarinsäureakkumulation (Razzaque und Ellis, 1977). Die LBA-Linien zeigten Aktivitäten um die 3 µkat/kg, wobei Kultur LBA 10 leicht unter 2 µkat/kg liegt und LBA 8 bei beinahe 4 µkat/kg. Ähnlich verhält es sich mit den pART- und HPPR RNAi-Linien. Hier zeigen pART1 und HPPR RNAi2 Aktivitäten von fast 4 µkat/kg und die Linien pART6 und HPPR RNAi 1 und 7 liegen bei nur etwa 2 µkat/kg. Auch die HPPR-Überexpressionslinien zeigen Aktivitäten um 2 bis 3 µkat/kg. Die RAS RNAi-Linien 5, 6 und 7 haben Aktivitäten von etwa 4 µkat/kg, wobei Linie 7 mit fast 5 µkat/kg eine recht hohe Aktivität aufweist. Die Linien RAS RNAi 8 und 10 hingegen liegen deutlich darunter bei etwa 2 µkat/kg. Die Wert der PAL-

Aktivität der RAS-Überexpressions-Linien 4, 5, 6 und 7 variieren nur leicht und liegen um 2 bis 3 $\mu\text{kat/kg}$. Linie 35S RAS 1 erreicht mit 6 $\mu\text{kat/kg}$ eine sehr hohe PAL-Aktivität (Abb. 4.37. und 4.38.).

4.3.4.4. HPPR-Aktivität

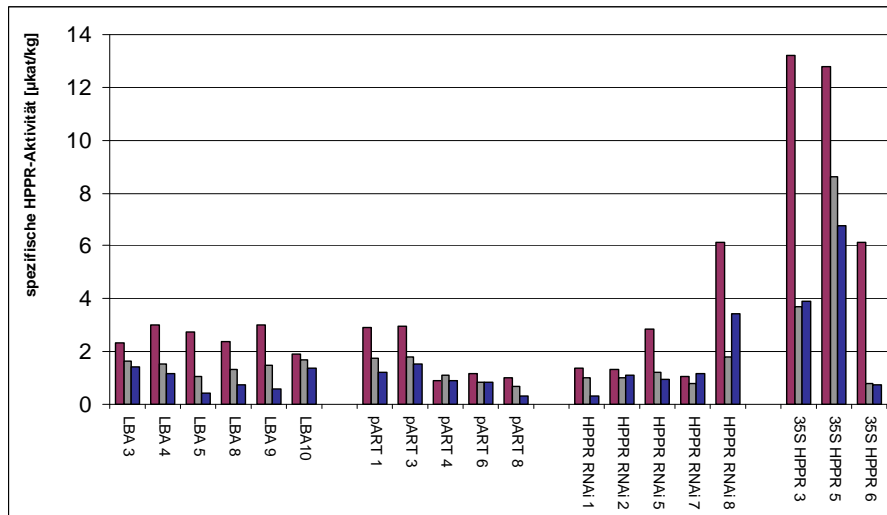


Abb. 4.39.: Spezifische HPPR-Aktivität in Proteinextrakten aus Wurzelmaterial aus drei verschiedenen Ernten (Ernte 7, 9 und 10).

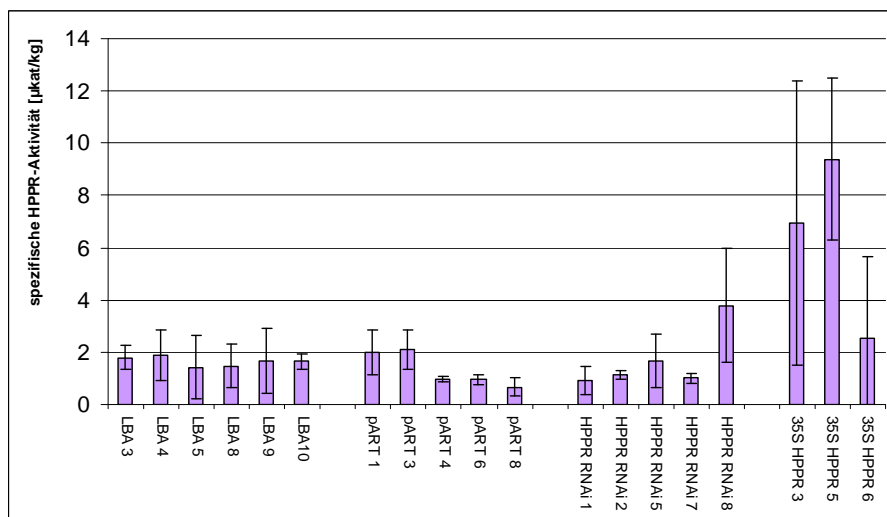


Abb. 4.40.: Gemittelte Werte der spezifischen HPPR-Aktivität aus Abb. 4.39. Standardabweichungen.

Von der HPPR wird vermutet, dass sie ein spezifisches Enzym für die Rosmarinsäurebiosynthese ist. Aufgrund der erschwerten Messungen wurden hier nur die Kontrolllinien LBA und pART, sowie die HPPR RNAi und HPPR-Überexpressionslinien vermessen. Die Werte der Kontrolllinien und der HPPR RNAi-Linie so wie der 35S HPPR-

Linie 6 liegen im Bereich von 2 $\mu\text{kat/kg}$. Die Werte der Überexpressionslinien 3 und 5 liegen zwischen 7 und 9 $\mu\text{kat/kg}$ und sind damit 3,5- bzw. 4,5-mal so hoch (Abb. 4.39. und 4.40.).

4.3.4.5. RAS-Aktivität

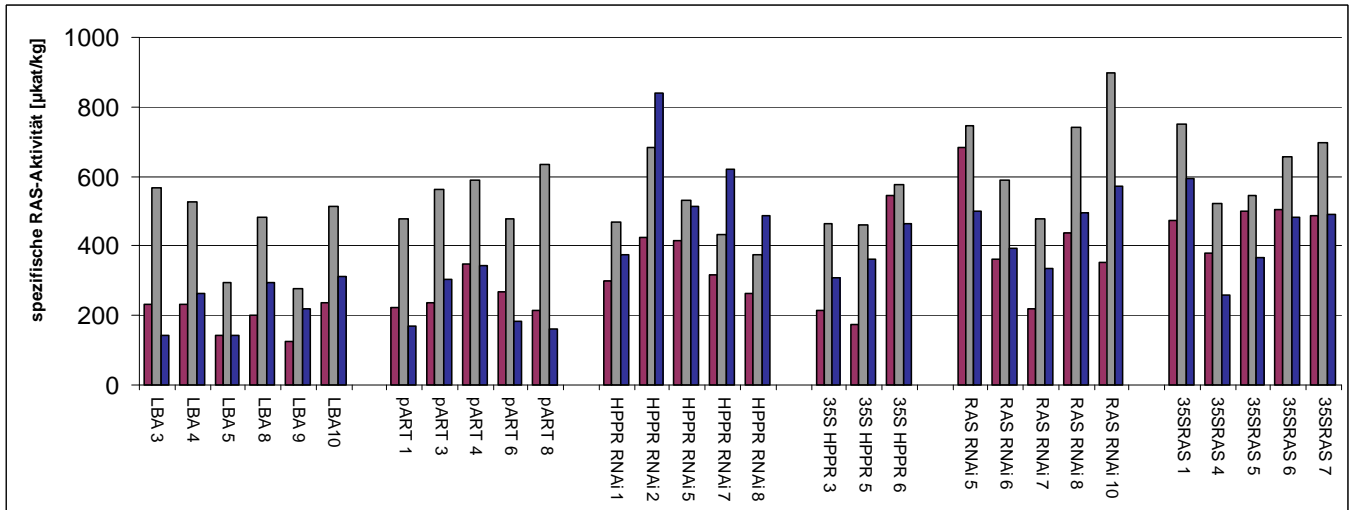


Abb. 4.41.: Spezifische RAS-Aktivität gemessen in Proteinrohextrakten aus Wurzelkulturen aus drei verschiedenen Ernten (Ernte 8, 9 und 10).

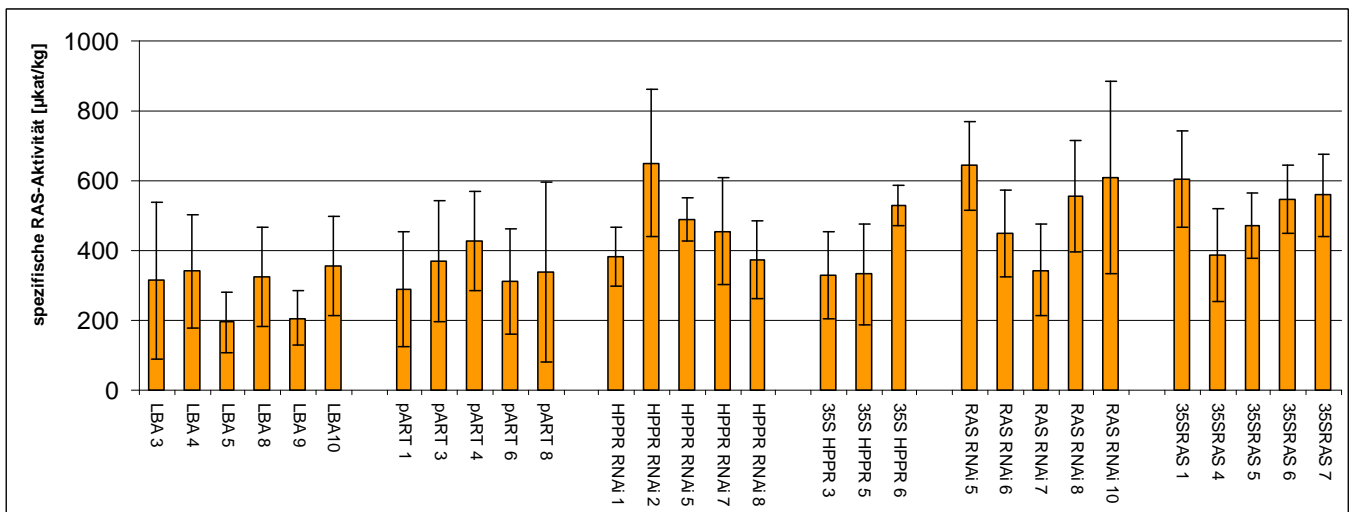


Abb. 4.42.: Gemittelte Werte der spezifischen RAS-Aktivität aus Abb. 4.41. der drei Ernten und entsprechende Standardabweichungen.

Die RAS ist eines der spezifischen Enzyme der Rosmarinsäurebiosynthese. Die Messungen wurden mit Caffeoyl-CoA und pHPL als Substraten durchgeführt. Die Werte der Kontroll-Linien LBA und pART liegen im Bereich von 300-400 $\mu\text{kat/kg}$. Die Linien HPPR RNAi, 35S

HPPR, RAS RNAi und 35S RAS weisen etwas höhere Werte im Bereich von 400-600 $\mu\text{kat/kg}$ auf (Abb. 4.41. und Abb 4.42.).

4.3.5. Akkumulation von Zwischenprodukten der Rosmarinsäurebiosynthese

Da es bei den RNAi-Linien möglich ist, dass sich aufgrund der blockierten Synthesewege Zwischenprodukte der Rosmarinsäurebiosynthese anhäufen, wurden die Gehalte an Zimtsäure, 4-Cumarsäure und 4-Hydroxyphenylpyruvat gemessen. Zusätzlich wurde Kaffeesäure bestimmt, welche eventuell als Überschussprodukt aus 4-Cumarsäure entstehen könnte. Des Weiteren wurde versucht, die drei nicht vollständig hydroxylierten Vorstufen der Rosmarinsäure (4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllaktat, Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllaktat und 4-Cumaroyl-3',4'-Dihydroxyphenyllaktat) zu detektieren. Die Ergebnisse der HPLC-Messungen sind in der Tabelle 4.5. zusammengefasst. Außer Kaffeesäure in sehr geringen Mengen konnten keine der anderen Zwischenprodukte mit den angewendeten Methoden detektiert werden. Der Kaffeesäuregehalt ist bei allen Transformanten in etwa gleich niedrig und korreliert nicht mit der Rosmarinsäuremenge (Abb. 4.43.). Exemplarisch wurde jeweils nur eine Linie der verschiedenen Transformationen vermessen.

4-Cumarsäure	-
Zimtsäure	-
Kaffeesäure	+
4-Hydroxyphenylpyruvat	?/-
4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllaktat	-
Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllaktat	-
4-Cumaroyl-3',4'-Dihydroxyphenyllaktat	-

Tabelle 4.5.: Ergebnisse der Messungen von Zwischenprodukten der Rosmarinsäure-Biosynthese.

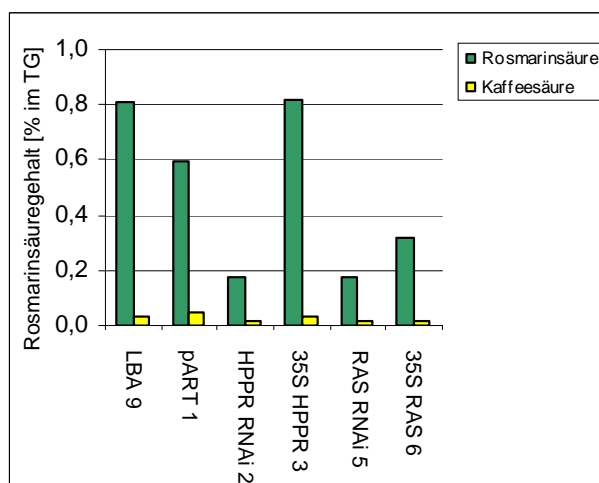


Abb. 4.43.: Darstellung des Rosmarinsäuregehalts und des Kaffeesäuregehalts aus Hairy Root-Linien im Vergleich.

4.3.6. Fütterungsexperimente

Um zu sehen, ob eventuell die Menge der Ausgangsverbindungen für die Rosmarinsäurebiosynthese limitierend ist, wurde jeweils eine Linie von LBA, 35S HPPR und 35S RAS ausgewählt und das Medium mit den Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin angereichert (20 µg/ml Medium). Zur Kontrolle wurden dieselben Linien zusätzlich in normalem Medium kultiviert. Anschließend wurde Rosmarinsäure extrahiert und der Gehalt bestimmt. Abb. 4.44. zeigt, dass der Rosmarinsäuregehalt der Kontrollen sich nicht wesentlich von dem Rosmarinsäuregehalt der mit Aminosäuren versehenen Kulturen unterscheidet. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt mit jeweils demselben Ergebnis.

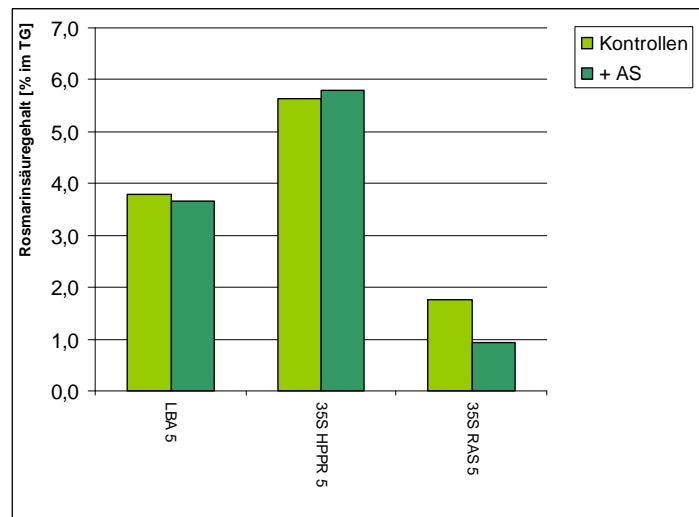


Abb. 4.44.: Exemplarische Darstellung des Rosmarinsäuregehalts der mit Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin supplementierten Kulturen und unbehandelte Kontrollen.

4.4. Charakterisierung der rekombinanten Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) aus *Arabidopsis thaliana*

Die cytoplasmatische Hydroxypyruvat Reduktase 2 (HPR2) wird als Enzym der Photorespiration angesehen, das die Aufgabe der peroxisomalen HPR1 übernehmen bzw. unterstützen kann.

Die K_m -Werte für Substrate und Cosubstrate wurden photometrisch bestimmt. Es wurde bei einer Wellenlänge von 380 nm die Abnahme der NADPH- bzw. NADH-Konzentration über einen Zeitraum von etwa 5 Minuten gemessen. Zur Auswertung wurde die Steigung der linearen Bereiche bestimmt und für die Berechnungen der spezifischen Aktivität eingesetzt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Konzentrationen der nicht variierten Substrate im gesättigten Bereich lagen. Für die einzelnen K_m -Werte sind exemplarische Graphen dargestellt, die aus Doppelmessungen gemittelt wurden. Für die endgültige Bestimmung von K_m -Werten wurden jeweils drei Doppelmessungen gemittelt.

4.4.1. K_m -Werte für das Cosubstrat NADPH

4.4.1.1. K_m -Wert für NADPH mit dem Substrat Hydroxypyruvat

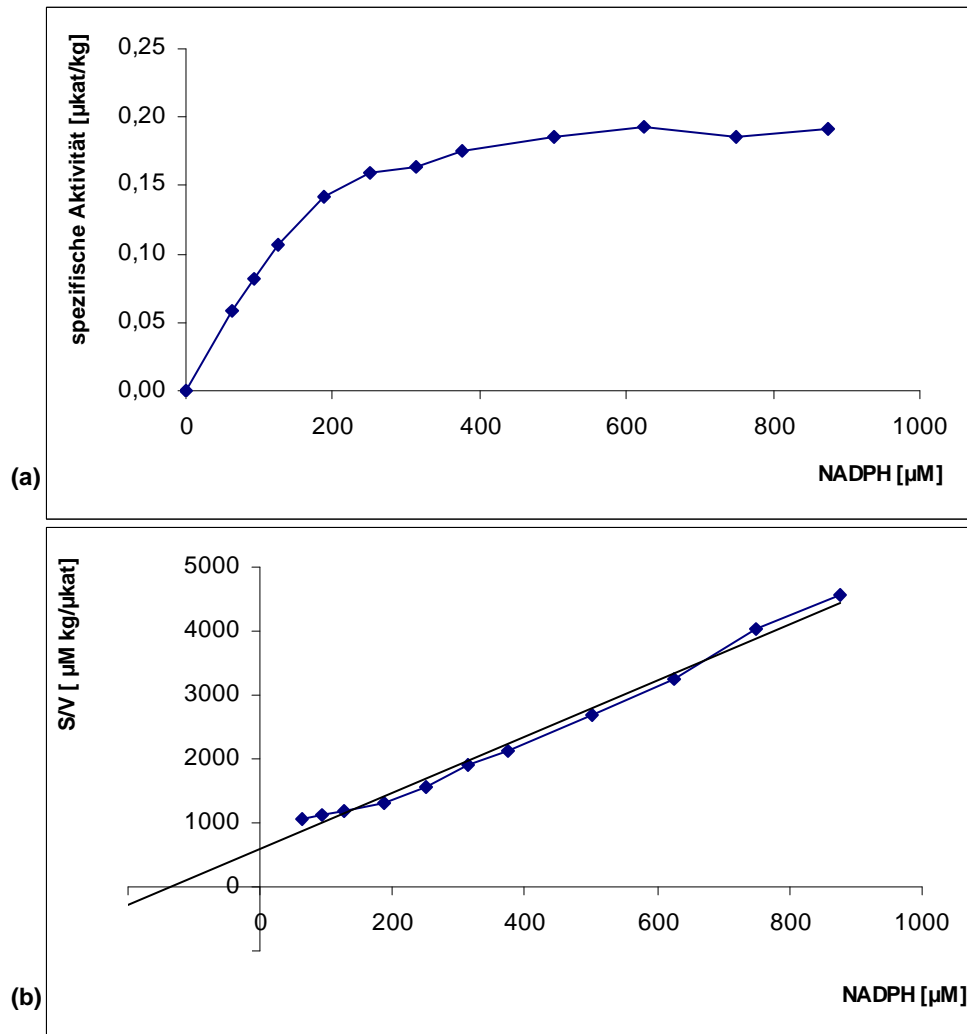


Abb. 4.45.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der NADPH-Konzentration mit Hydroxypyruvat als Substrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 135 μM.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für NADPH für das Substrat Hydroxypyruvat wurden 0,4 μg Protein eingesetzt und 2,5 mM Hydroxypyruvat. NADPH wurde in einem Bereich von 31,25 bis 875 μM variiert.

In der Sättigungskurve (Abb. 4.45. (a)) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 250 μM NADPH liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 132 μM (vgl. Abb. 4.45. (b)).

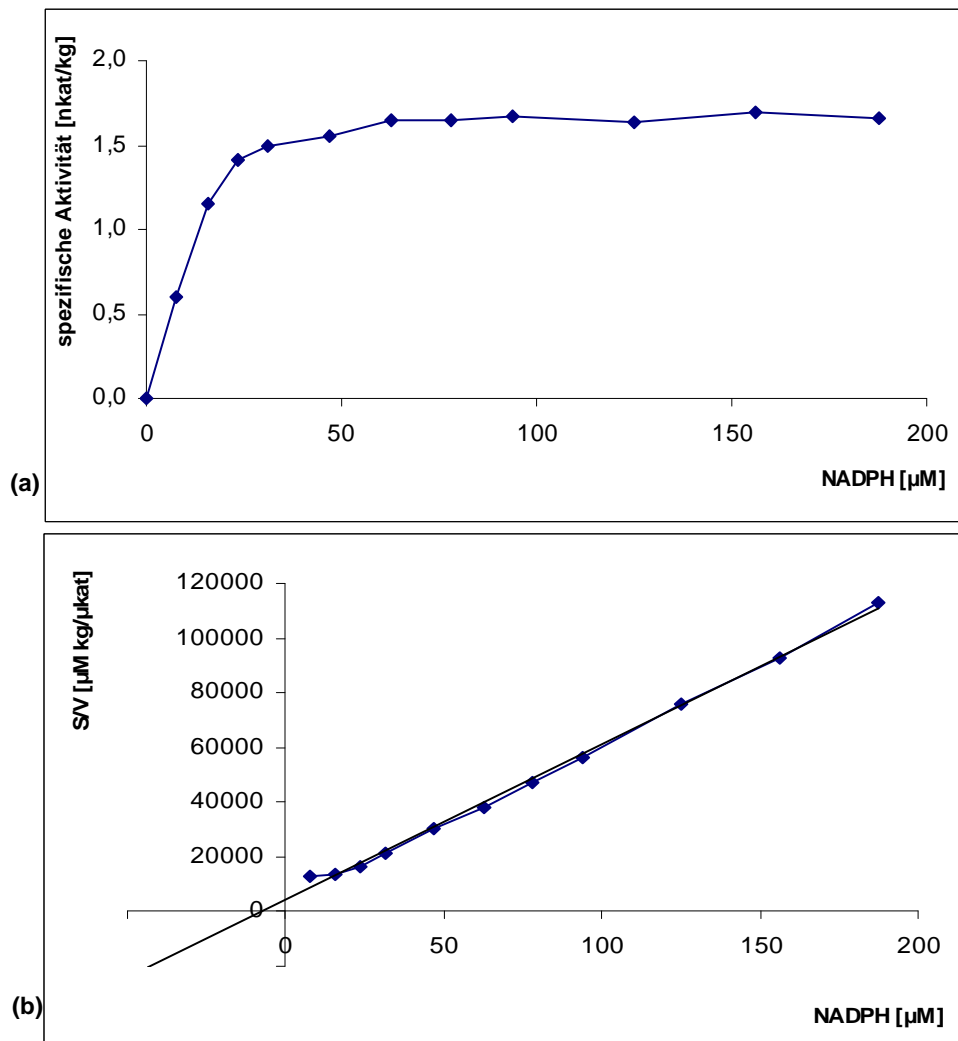
4.4.1.2. K_m -Wert für NADPH mit dem Substrat Pyruvat

Abb. 4.46.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der NADPH-Konzentration mit Pyruvat als Substrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 7,3 μM .

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für NADPH mit dem Substrat Pyruvat wurden etwa 6,2 μg Protein eingesetzt und 80 mM Pyruvat. NADPH wurde in einem Konzentrationsbereich von 7,8-200 μM variiert.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.46. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 25 μM NADPH liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 8,2 μM (vgl. Abb. 4.46. (b)).

4.4.2. K_m -Werte für das Cosubstrat NADH

4.4.2.1. K_m -Wert für NADH mit dem Substrat Hydroxypyruvat

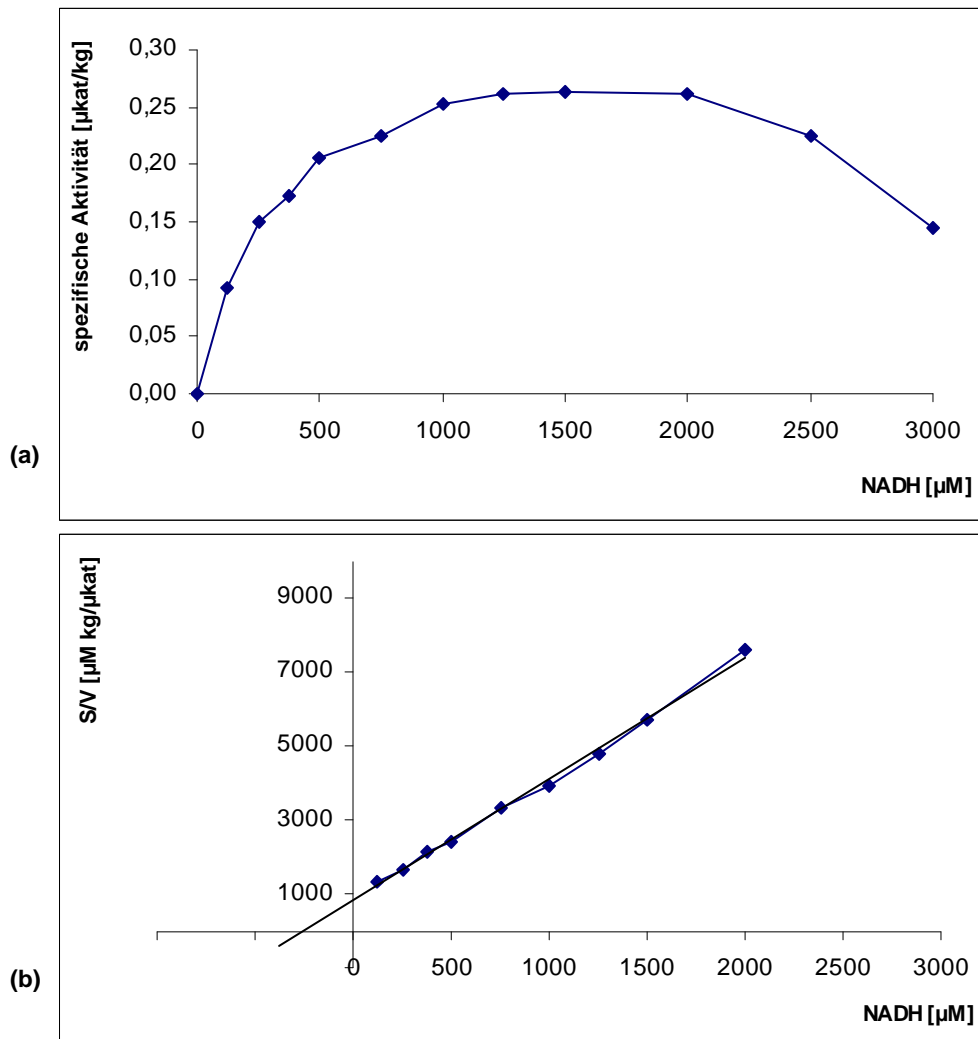


Abb. 4.47.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der NADH-Konzentration mit Hydroxypyruvat als Substrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert liegt bei 254 µM. Bei der Hanes-Woolf-Auftragung wurden die beiden höchsten NADPH-Konzentrationen nicht mit verwendet, da hier Substratsättigung eingetreten war und bei der Bestimmung des K_m -Wertes nicht mit einbezogen wurden.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für NADH für das Substrat Hydroxypyruvat wurden 0,2 µg Protein eingesetzt und 2,5 mM Hydroxypyruvat. NADH wurde im Bereich von 125-3000 µM eingesetzt.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.47. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 1000 µM NADH liegt. Eine Hemmung tritt bei etwa 2000 µM NADH ein. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 260 µM (vgl. Abb. 4.47. (b)). Trotz der Substrat-Hemmung stimmen der ermitteltet und der aus der Substratsättigungskurve abschätzbare K_m -Wert in etwa über ein.

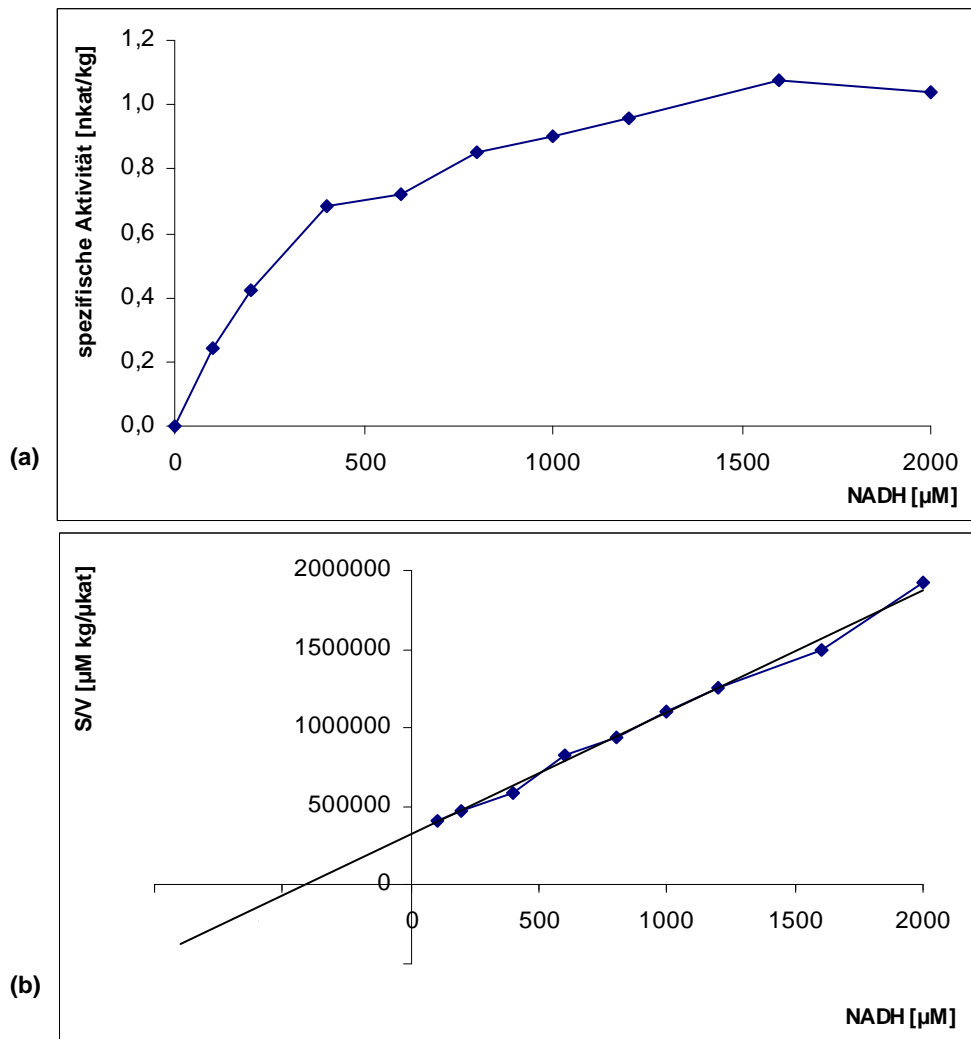
4.4.2.2. K_m -Wert für NADH mit dem Substrat Pyruvat

Abb. 4.48.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der NADH-Konzentration mit Pyruvat als Substrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 410 μM .

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für NADH für das Substrat Pyruvat wurden 7,6 μg Protein eingesetzt und 80 mM Pyruvat. NADH wurde im Konzentrationsbereich von 200-2400 μM variiert.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.48. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 1000 μM NADH liegt. Eine Hemmung wurde hier nicht beobachtet. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 400 μM (vgl. Abb. 4.48. (b)).

4.4.3. K_m -Werte für Hydroxypyruvat, Pyruvat und Glyoxylat mit dem Cosubstrat NADPH

4.4.3.1. K_m -Wert für Hydroxypyruvat mit dem Cosubstrat NADPH

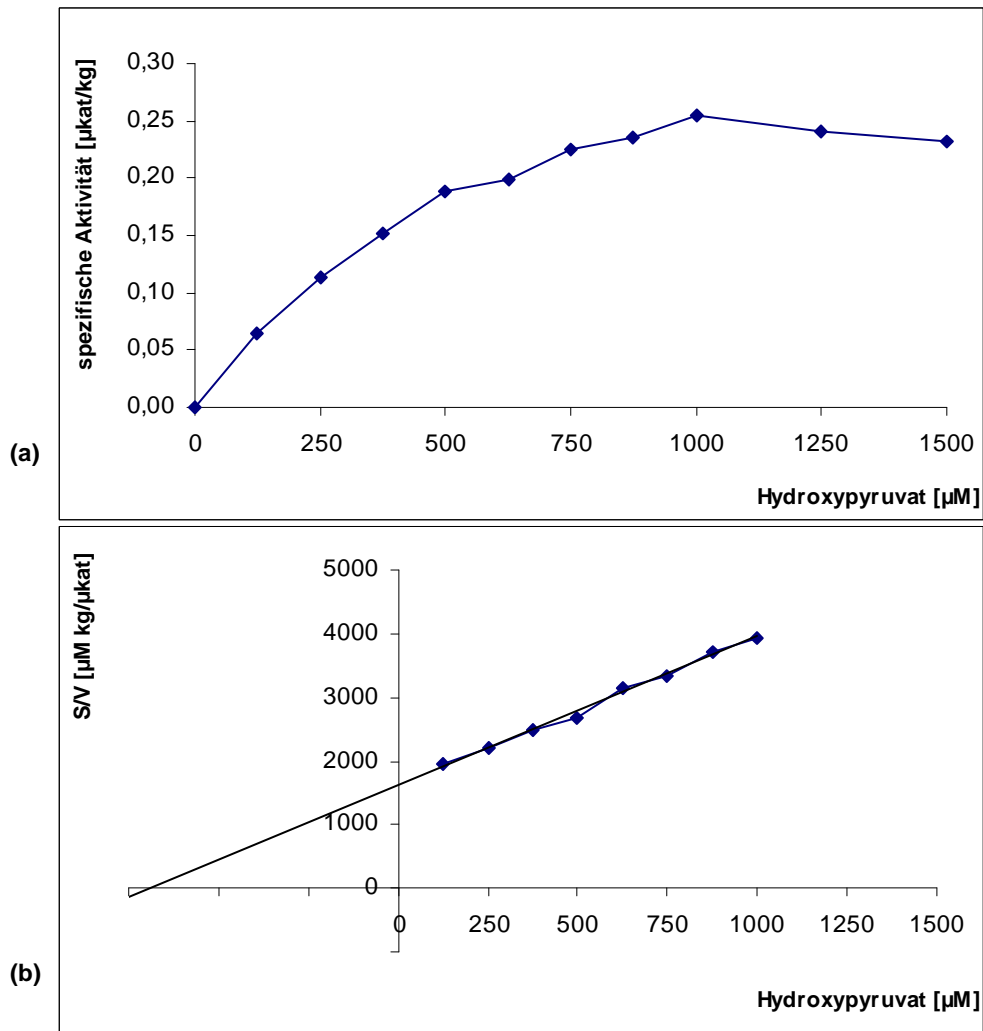


Abb. 4.49.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der Hydroxypyruvat-Konzentration mit NADPH als Substrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 731 μM . Bei der Hanes-Woolf-Auftragung wurden die beiden höchsten Hydroxypyruvat-Konzentrationen nicht mit verwendet, da hier Substratsättigung eingetreten war und bei der Bestimmung des K_m -Wertes nicht mit einbezogen wurden.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für NADH für das Substrat Pyruvat wurden 0,2 μg Protein eingesetzt und 0,625 mM NADPH. Hydroxypyruvat wurde von 125 – 1500 μM eingesetzt.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.49. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 1000 μM Hydroxypyruvat liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 0,711 mM. Da jedoch eine

Substratsättigung vorherrscht, ist die Ermittlung des K_m -Wertes erschwert. Betrachtet man sich die Sättigungskurve, kann man vermuten, dass der tatsächliche K_m -Wert bei etwa 300 μM liegt (vgl. Abb. 4.49. (b)).

4.4.3.2. K_m -Wert für Pyruvat mit dem Cosubstrat NADPH

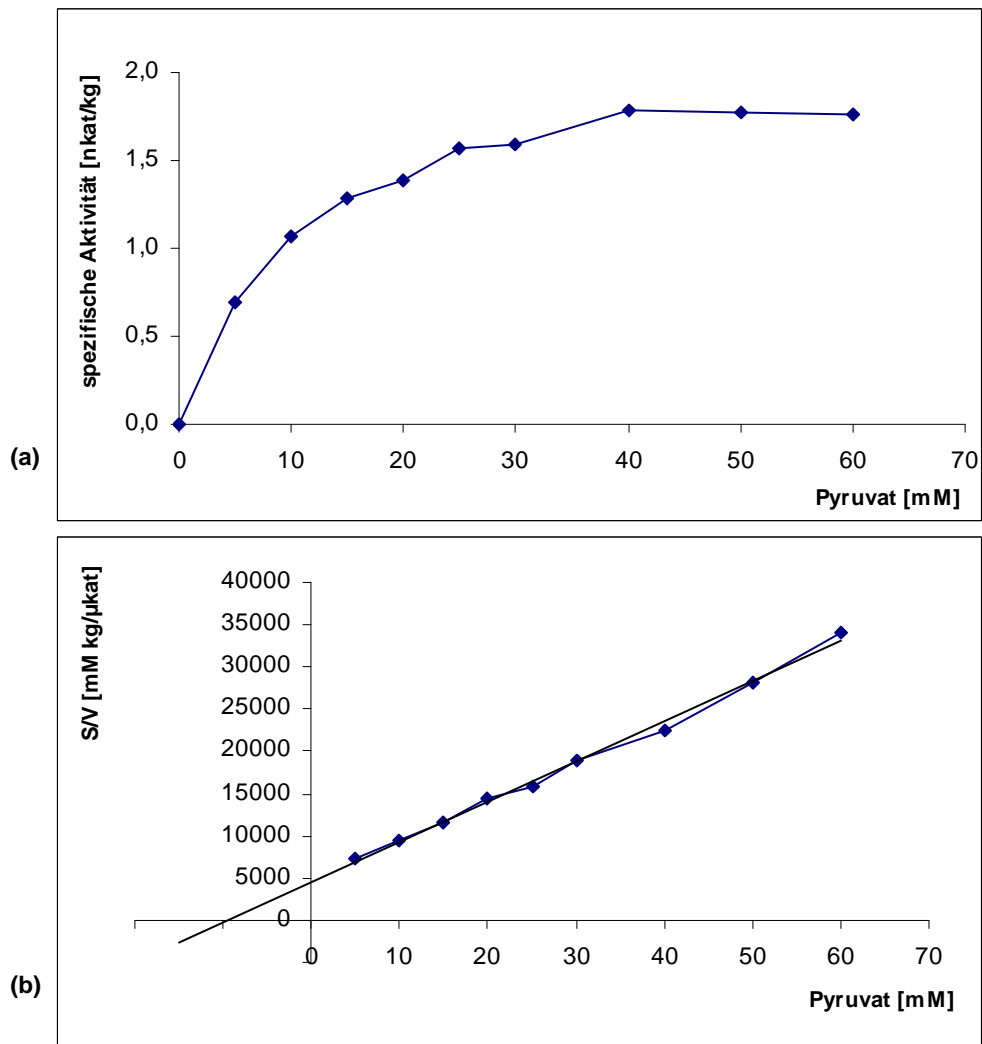


Abb. 4.50.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der Pyruvat-Konzentration mit NADPH als Substrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 9,3 mM.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für Pyruvat mit dem Cosubstrat NADPH wurden 10,4 μg Protein eingesetzt und 0,625 mM NADPH. Pyruvat wurde von 5-70 mM eingesetzt.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.50. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 40 mM Pyruvat liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 10,3 mM (vgl. Abb. 4.50. (b)).

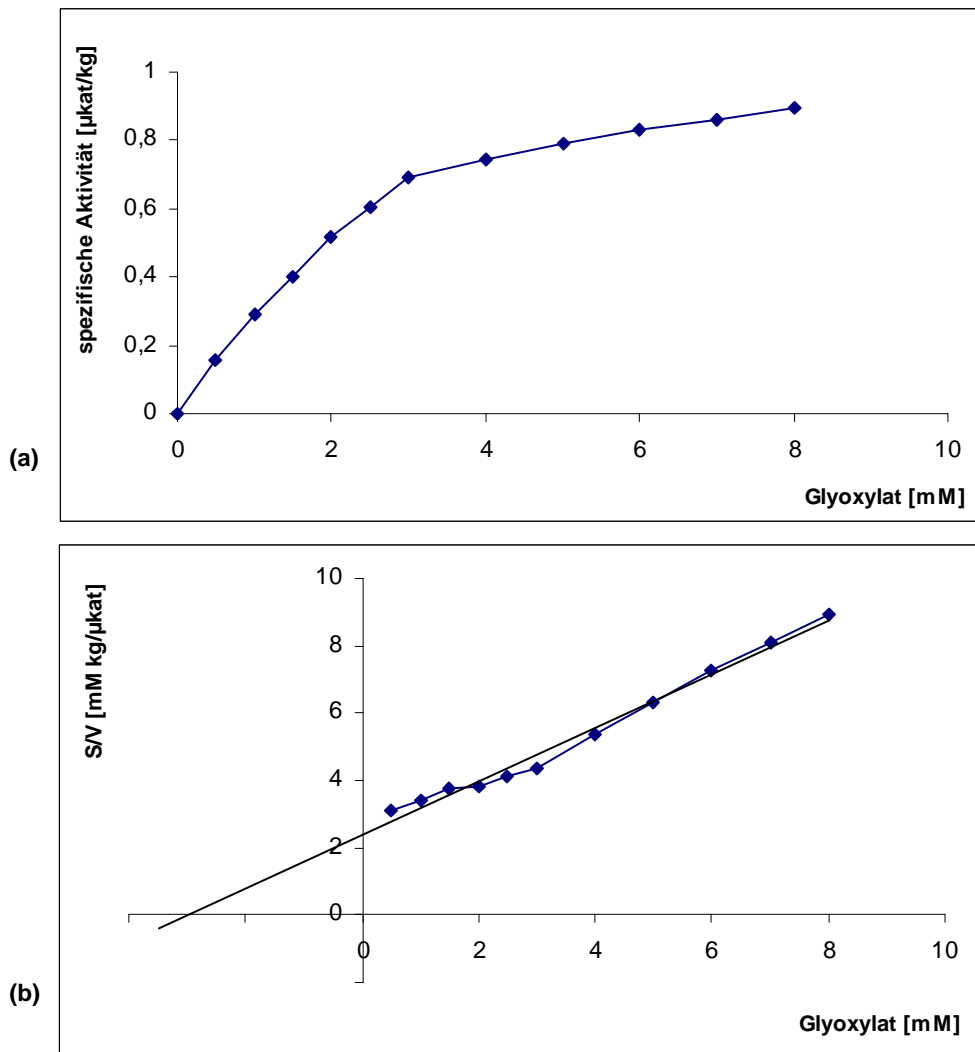
4.4.3.3. K_m -Wert für Glyoxylat mit dem Cosubstrat NADPH

Abb. 4.51.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der Glyoxylat-Konzentration mit NADPH als Cosubstrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 3 mM.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für Glyoxylat mit dem Cosubstrat NADPH wurden 0,4 μg Protein eingesetzt und 2,5 mM NADPH. Glyoxylat wurde von 0,5-8 mM eingesetzt.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.51. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 5 mM Glyoxylat liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 3 mM (vgl. Abb. 4.51. (b)).

4.4.4. K_m -Werte für Hydroxypyruvat und Pyruvat mit dem Cosubstrat NADH

4.4.4.1. K_m -Wert für Hydroxypyruvat mit dem Cosubstrat NADH

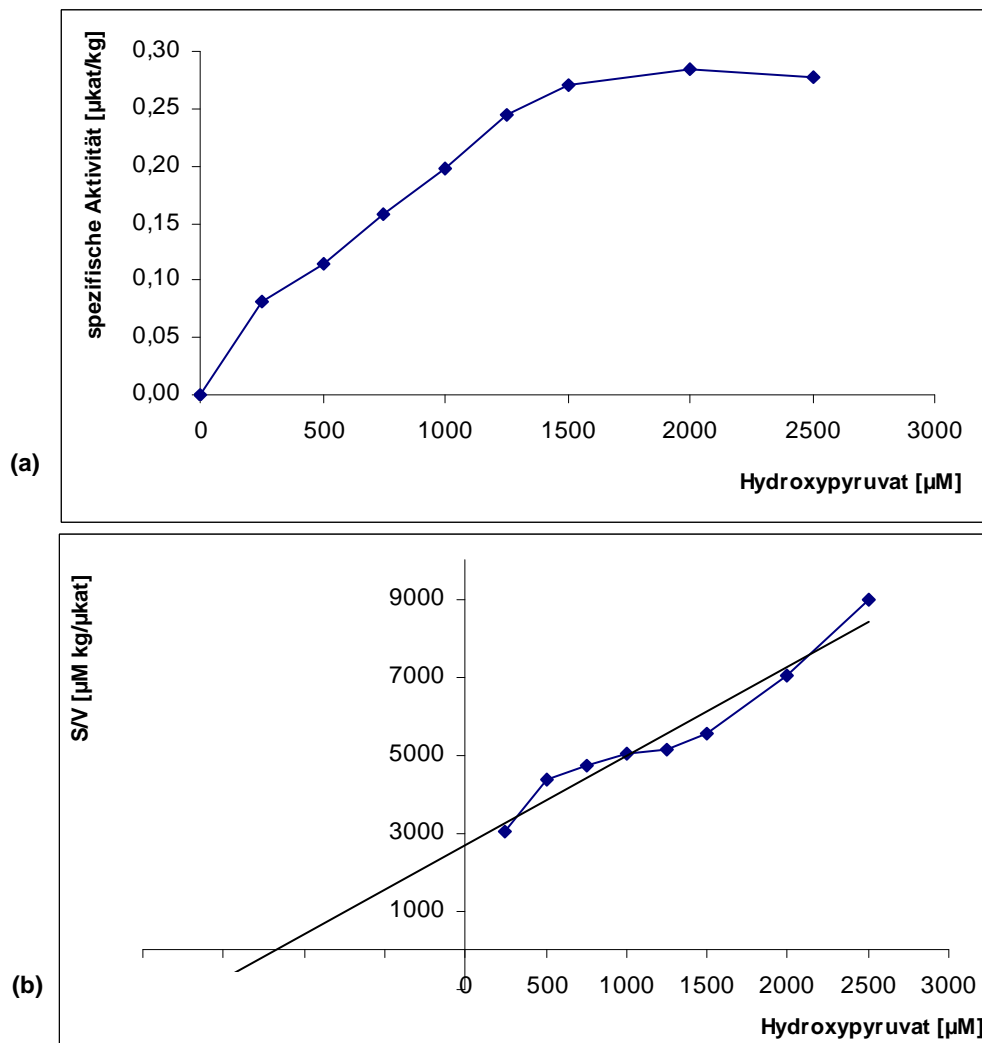


Abb. 4.52.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der Hydroxypyruvat-Konzentration mit NADH als Cosubstrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 0,85 mM.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für Hydroxypyruvat für das Cosubstrat NADH wurden 0,3 µg Protein eingesetzt und 2 mM NADH. Hydroxypyruvat wurde von 250 bis 4000 µM eingesetzt.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.52. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 2000 µM Glyoxylat liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 1,1 mM (vgl. Abb. 4.52. (b)).

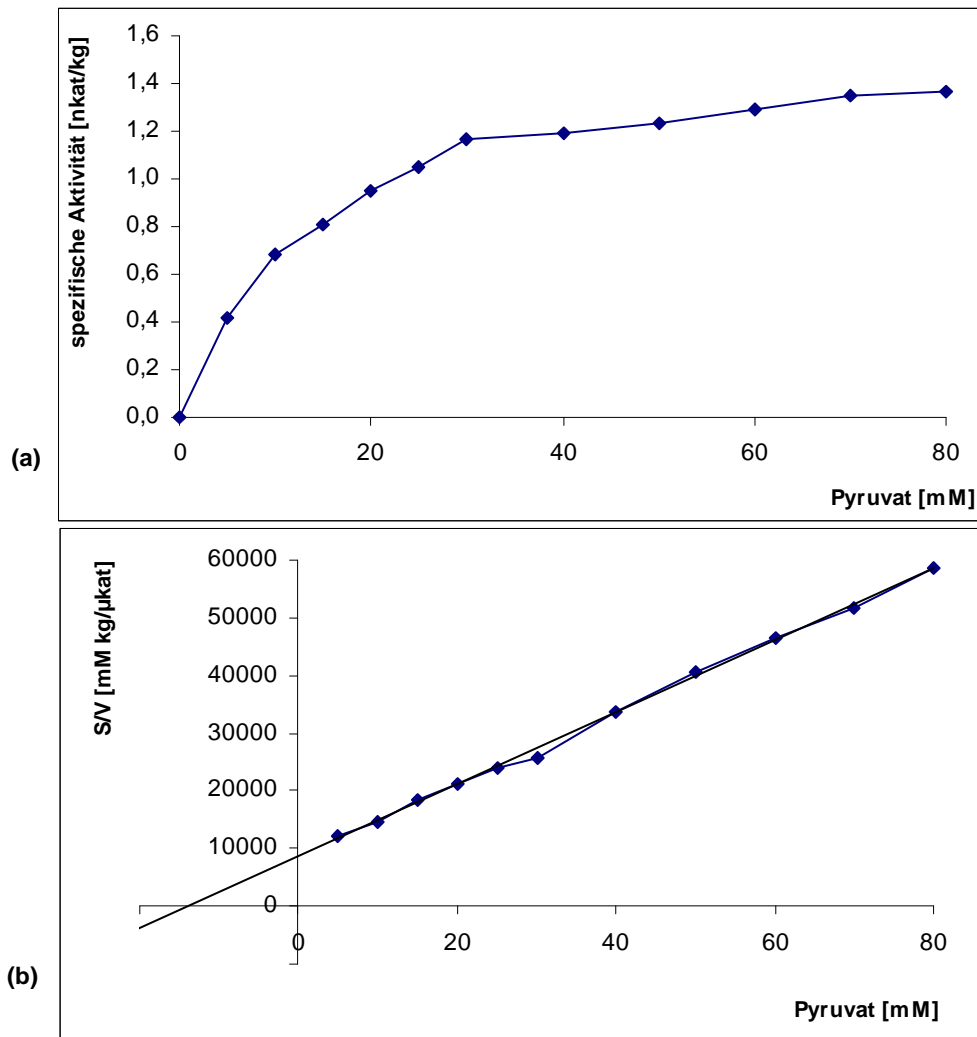
4.4.4.2. K_m -Wert für Pyruvat für das Cosubstrat NADH

Abb. 4.53.: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPR2 von der Pyruvat-Konzentration mit NADH als Cosubstrat. **(a)** Sättigungskurve; **(b)** lineare Auftragung nach Hanes-Woolf, der daraus ermittelte K_m -Wert ist 13,7 mM.

In einem Reaktionsansatz für die Bestimmung des K_m -Wertes für Pyruvat für das Cosubstrat NADH wurden 12 μ g Protein eingesetzt und 2 mM NADH. Pyruvat wurde von 5-70 mM eingesetzt.

In der Sättigungskurve in Abb. 4.53. (a) ist zu sehen, dass der Übergang in den Sättigungsbereich bei etwa 50 mM Pyruvat liegt. Aus der linearen Auftragung nach Hanes-Woolf ergibt sich ein gemittelter K_m -Wert von 14,1 mM (vgl. Abb. 4.53. (b)).

4.4.5. Temperatur-Optimum

Das Temperatur-Optimum wurde für die Substrate Hydroxypyruvat und Pyruvat mit dem Cosubstrat NADPH bestimmt. Für das Temperatur-Optimum mit Hydroxypyruvat wurden 0,875 mM NADPH und 1,5 mM Hydroxypyruvat eingesetzt. Für das Temperatur-Optimum mit Pyruvat wurden 0,156 mM NADPH und 60 mM Pyruvat eingesetzt. Die Messungen fanden an einem Photometer mit temperierbaren Küvettenhalterungen statt. Es wurde jeweils die Temperatur im Reaktionsansatz bestimmt und von etwa 22-57 °C in etwa 5° C-Abständen gemessen. Wie in Abb. 4.54. zu sehen, liegt das Temperatur-Optimum für beide Substrate bei 53°C. Es sind (wie bei den K_m -Werten) exemplarische Graphen abgebildet, die aus Doppelwerten gemittelt wurden. Die Endwerte des Temperatur-Optimums wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

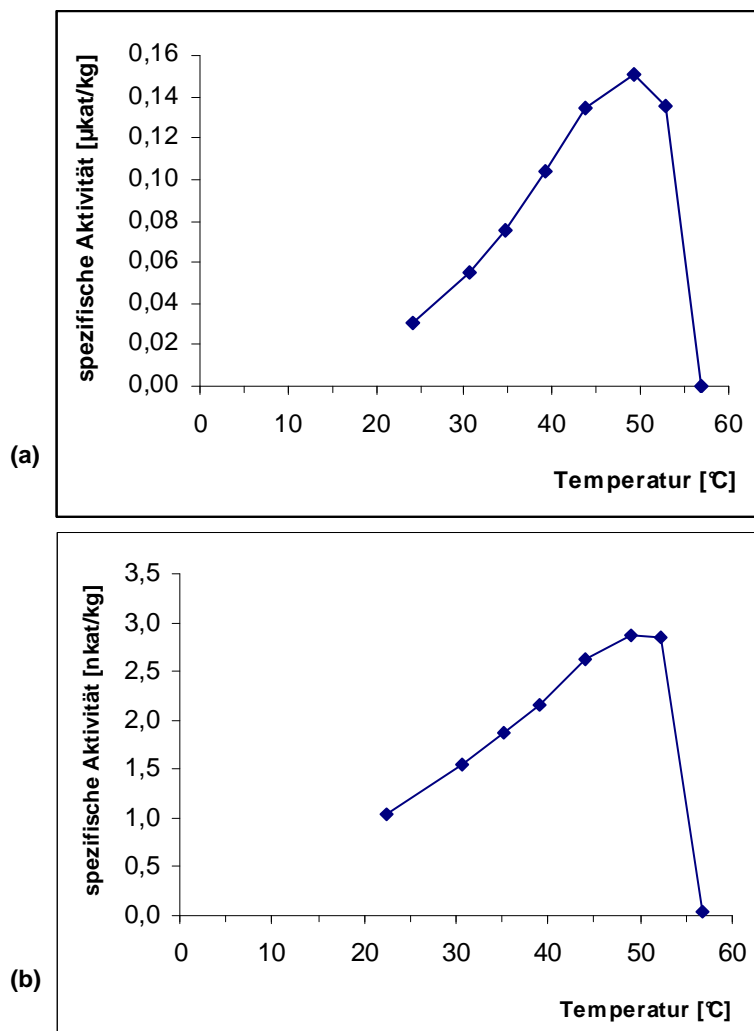


Abb. 4.54.: Temperatur-Optimum der HPR2 (a) für Hydroxypyruvat; (b) für Pyruvat als Substrat.

4.4.6. pH-Optimum

Das pH-Optimum wurde für die Substrate Hydroxypyruvat und Pyruvat mit dem Cosubstrat NADPH bestimmt. Für das pH-Optimum mit Hydroxypyruvat wurden 0,875 mM NADPH und 1,5 mM Hydroxypyruvat eingesetzt. Für das pH-Optimum mit Pyruvat wurden 0,156 mM NADPH und 60 mM Pyruvat eingesetzt. Es wurde nur das pH-Optimum in KP_i -Puffer bestimmt. Es wurden jeweils die pH-Werte in den Reaktionsansätzen bestimmt und im pH-Bereich pH 2,3 bis pH 12,0 gemessen. Wie in Abb. 4.55. zu sehen, liegen die pH-Optima für Hydroxypyruvat und für Pyruvat über einen breiteren Bereich von pH 7,4 bis 8,3. Es sind wie bei den K_m -Werten exemplarische Graphen abgebildet, die aus Doppelwerten gemittelt wurden. Die Endwerte des pH-Optimums wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

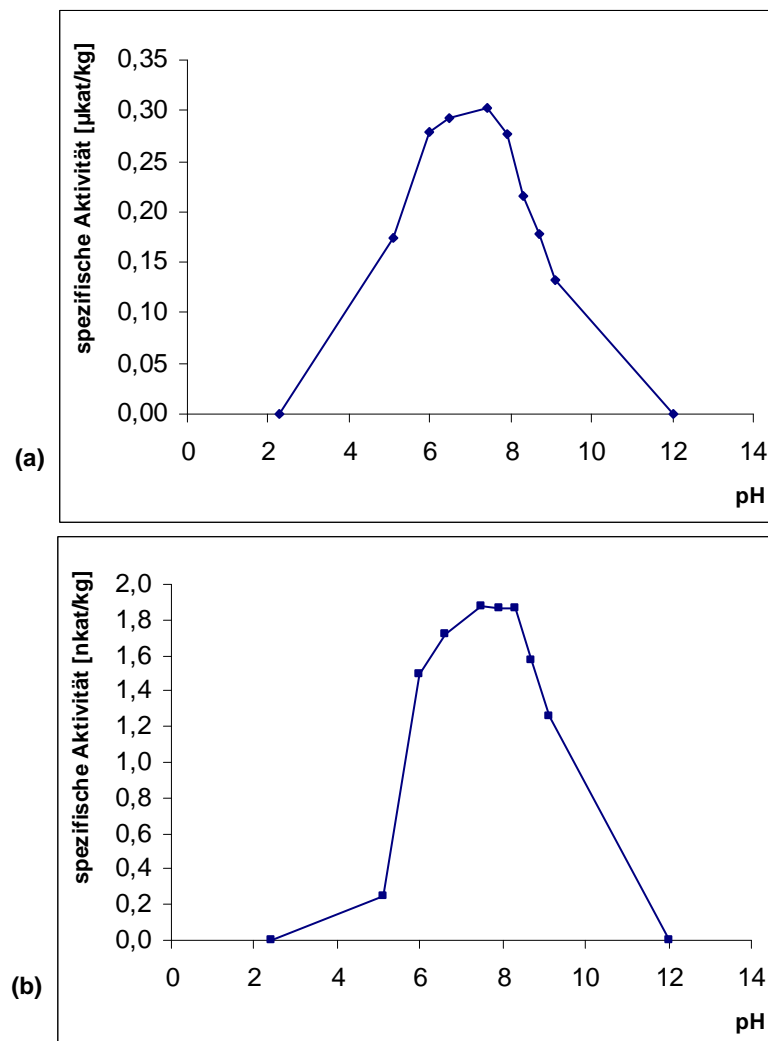


Abb. 4.55.: pH-Optimum der HPR2 **(a)** für Hydroxypyruvat; **(b)** für Pyruvat als Substrat.

4.4.7. Zusammenfassung der Charakterisierungsdaten

In Tabelle 4.6. sind die einzelnen in der Charakterisierung ermittelten Werte tabellarisch zusammengefasst. Zusätzlich wurden Glycerat und Lactat getestet, die beide Substrate für die Rückreaktion der HPR2 sind. Sie wurden in Kombination mit den Cosubstraten NADP und NAD angeboten. Es wurde jedoch nur Glycerat umgesetzt, Lactat nicht.

	Hydroxypyruvat	Pyruvat
Temperatur-Optimum	53°C	53°C
pH-Optimum	7,4	7,4 – 8,3
K _m für NADPH	0,132 mM	0,0082 mM
K _m für NADH	0,260 mM	0,400 mM

	NADPH	NADH
K _m für Hydroxypyruvat	0,711 mM	1,1 mM
K _m für Pyruvat	10,3 mM	14,1 mM
K _m für Glyoxylat	3 mM	nicht ermittelt

	Glycerat	Lactat
NADP	+	-
NAD	+	-

Tabelle 4.6.: Zusammenfassung der ermittelten K_m-Werte, pH- und Temperatur-Optima und zusätzlich getesteten Substrate für HPR2 aus *Arabidopsis thaliana*.

4.5. Genomische Faktoren der HPPR aus *Coleus blumei*

Um zu untersuchen, wie spezifisch der RNAi-Sequenzbereich der HPPR (Abb. 2.2.) tatsächlich ist, wurde ein Southern Blot mit der RNAi-Sequenz als Sonde durchgeführt. Da bisher jedoch nicht bekannt war, ob die HPPR ein Intron besitzt, wurde dies ebenfalls geklärt.

Zur Amplifikation der HPPR aus gDNA wurden die Volllängen-Primer verwendet (Kapitel 2.1.1.). Es konnte ein Produkt von etwa 2100 bp Länge amplifiziert werden (Abb. 4.56.). Dieses PCR-Produkt wurde aus dem Gel aufgereinigt und direkt für die Sequenzierung verwendet. Es handelte sich tatsächlich um die HPPR mit einem Intron. Die Sequenz und die Lage der HPPR sind in Abb. 4.57. dargestellt. Das Intron ist 1150 bp lang und beginnt bei Base 423 der HPPR, ist also ein Phase-0-, GT-AG-Intron (Rogozin et al., 2005). Ein Bereich von etwa 200 bp konnte bis zur Fertigstellung der Arbeit nicht korrekt aufgeklärt werden, da die Sequenzierungsergebnisse in diesem Bereich leichte Abweichungen zeigten. Dies ist jedoch nur auf die in den Endbereichen schlecht auswertbaren Sequenzierungen zurückzuführen. Eine erneute Sequenzierung zur vollständigen Sequenzaufklärung könnte mit im Intron liegenden Primern durchgeführt werden.

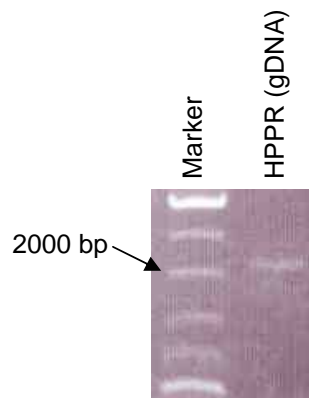


Abb. 4.56.: PCR-Amplifikat der HPPR mit Volllängen-Primern aus genomischer DNA.

```

atggaggcgattggcggttttgatgatgtgcccgatgagcacctacttgagcaagagcttgacaagc
gggttcaagctctttcgttactggactcagccggcgagcgcgacttcctcgctctgcaggccgagtc
tatccgcgcgggtgggttgggaattcgaacgcgggtgccgatgctgagttgatcgacgcactgccgaaa
ctggagattgtgtcgagcttttagcgtgggtctggataaggttgacttgatcaagtgtgaggagaagg
gggttagggttaccaacacgcccgatgtgctgacggatgacgtcgcggtttggcgatcgggttgat
tttggcggttttgaggcggatttgtgagtgatgataagtatgtgaggagaggggctggaaatttga
gacttcaagttgacgactaagGTATACTGTTTGATTCTGTGATTTTGATGCCCCCTGCTTCGTGATG
TTGGGTTCTCTGCTCTTATTTTATTACATTGCAATATGGATTGAGAGAATTTTTTGCCTTGGAATGTT
TTTGTTGTCTATAAAAGATGAATGGGTTTCATGTTTCCATATACACCAGGTGATCTATTCATGCACA
TGAAACATATGTGCTTGTGCAAGATTCTGGTTACATTTAATCCGTGTAATAGTTCACCATCCGTAAC
ATTTAATGACCCGACATGAAAAGGGTGAATCTTGAGTGTCTTTGCATCTATAGCATGCTATAAGTTT
CTGTATTTACTGTGAGATCGGAATTTCAACTCTTTAGTCATTTTTTTTGTTCATATCTGTGAAGT
TTTTCTAGTTAGCAGGCTGCCTGAGTTGAAGTGTGTTTATTTTTTGTTCGATGGTTAACCTCGACA
ATTTTGCATAAAGCCTGCTAAATCTCTTGTGGATTCTTTTGGGTGCTTCGTAGGGATAATTTT
ATACTTAGTAGATACTTCCCGTATTATCTTTTCGATCGTGTTCATGTTTAAGGGATTGAGGACTA
GCTTTATTGTGTCGTACATCTTAAGTTTCATGTGCTTGGTTTCTATTACTCATACAATTATTCTGTA
TTTGAGCATGCATATCTAGAGGAATTTATTGCCTAGAAAGTCTAAATTCAGTAGTTGGAGAGCGTTA
CATGTCTTGCAATTGAATGCATACCCAGTTGCACGGTTTATATACTAATGAATAACAATATGAATTA
CTGTCTAGTCCATTTGCTATTAGCAGTTTCAAATATTCGGAATCTTAATGAGACTTCCTGCAATGG
AAATGACTTCATATAATGGATATTCCTGTGGTTGTGTAGCTGCTTTTGGCTGCCCTGTTTCACCTCA
TGTTTATCGATAGAACAAAGTTCTATGCAATAGCCATGCTCAGCCTTCATGCAGAATTGCTAGAAGCA
TCGAAGATAAAGACATTAGTCATCGAATTTAGTGTCTTTTGTGCATTTTATTGTTGTATGCTCTCT
GTATTATTCTGCATGATTGTTTTGCTTCCTTTTGATAGTGATCTGTAGTCATGGATGGTAATGTTT
GGACGGCTTCTTAATCCATTTTGTCTATGCAGttcagcggtaaaagagttggcatcataggattggg
cagaatcgggttagcagttgctgagcgagcagaggcatttgattgtccaatcagttacttttcaaga
tccaagaaacccaacacaaactacacatactatggcagcggttgagaattggcgctcaaacagtgaca
tcctagtcgtagcatgtcccttgactccagaaacaaactcatattatcaatcgagaagtaatcgatgc
tctgggtccaaagggagttctcatcaacattggaaggggacctcatggtgatgagcccgaactgggtg
tctgctcttgtggagggccgtctgggtggcgctggtcttgatgtattcgaaaggggaaccagaggtac
cggagaagctcttcgggtctggaaaatgttgctcctgttgccacatgtagggagtggcaccgtggaaac
gcgtaaagtgtatggctgatcttgctcgtcggaacttggaagctcacttctccggcaagcctctctta
actccagtagtttga

```

Abb. 4.57.: Sequenz der HPPR (Kleinbuchstaben) aus *Coleus blumei* mit Intron (Großbuchstaben; rot/fett sichere Sequenz; schwarz/normal = abweichende Sequenz).

Für den Southern Blot wurden Restriktionsenzyme verwendet, die nicht oder einmal in der Sequenz der HPPR schneiden (Tabelle 4.7.). Dies gilt für die in Abb. 4.57. gezeigte Sequenz der HPPR mit Intron.

<i>Bcl</i>	1x
<i>Bam</i> HI	0x
<i>Eco</i> RV	0x
<i>Hind</i> III	0x
<i>Bgl</i>	0x

Tabelle 4.7.: Verwendete Restriktionsenzyme für den Southern Blot und die Anzahl der Schnittstellen in der genomischen HPPR-Sequenz mit Intron aus Abb. 4.57.

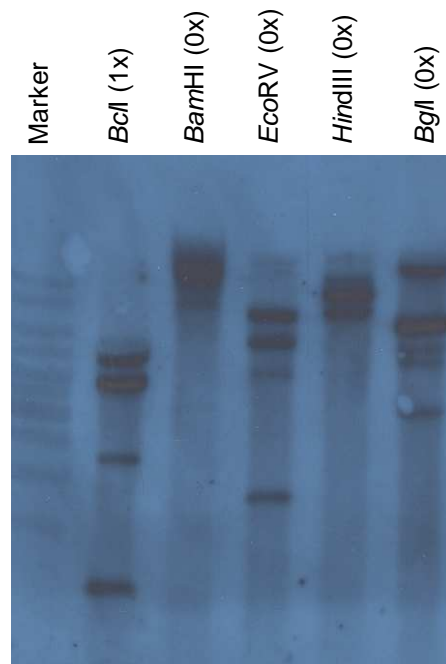


Abb. 4.58.: Southern Blot auf *Coleus blumei*-DNA mit dem RNAi-Fragment (siehe Abb. 2.2.) der HPPR (Kim et al., 2004) als Sonde. Die Zahlen, die in Klammern hinter den Restriktionsenzymen stehen, geben an, wie oft die Enzyme in der genomischen Sequenz, inklusive Intron, der HPPR schneiden. Da jedoch die Methode nicht optimiert wurde, kann keine Aussage über die genaue Anzahl der Genkopien gemacht werden.

Der Southern Blot für die HPPR wurde aus Zeitgründen nicht vollständig optimiert. Es kann also keine korrekte Aussage über die genaue Anzahl der Genkopien der HPPR gemacht werden. Es ist jedoch zu sehen (Abb. 4.58.), dass mit der RNAi-Sequenz als Sonde unter stringenten Bedingungen bei allen Restriktionsenzymen mehr als nur eine Bande zu sehen ist. Das lässt darauf schließen, dass mehr als nur ein Gen von dem RNAi-Effekt betroffen ist.

5. Diskussion

5.1. Herstellung und Analyse der RNAi- und Überexpressionskonstrukte

Die Erstellung der RNAi-Konstrukte in pART27 war erfolgreich. Bei den Sequenzierungen von HPPR RNAi und RAS RNAi ergaben sich jedoch einige Fehler in der Basenabfolge (Abb. 4.2. und Abb. 4.4.). Da nur die Ausbildung der Haarnadelstruktur des RNAi-Konstruktes gewährleistet sein muss, um eine doppelsträngige RNA zu erhalten und damit den Mechanismus der RNAi zu aktivieren, schienen die Sequenzen in dieser Hinsicht ausreichend. Außerdem ist für den Mechanismus der RNAi nicht unbedingt eine exakte Übereinstimmung der RNAi-Sequenz mit der Zielsequenz nötig (siehe Kapitel 1.1.2.), daher wurden die erstellten Konstrukte als ausreichend für Experimente erachtet und für die Transformation in Agrobakterien und anschließende Pflanzentransformation verwendet. Da das Genom von *Coleus blumei* nicht sequenziert ist, konnte jedoch nicht überprüft werden, ob möglicherweise andere Gene von RNAi-Effekten betroffen sind, die nicht als Ziel vorgesehen waren. Doch ist dies in vielen Fällen ohnehin nicht vollkommen auszuschließen. Die Wahrscheinlichkeit von „off-target“ Effekten kann mithilfe spezieller Datenbanken minimiert werden (z.B. <http://www5.appliedbiosystems.com/tools/siDesign/>). Zusätzlich werden unerwünschte Nebeneffekte der RNAi ab einer gewissen Länge der Doppelstrangbereiche der Haarnadelstruktur minimiert (Praveen et al., 2009). Da hier die Arme der Haarnadel etwa 750 bp lang sind, sollten unspezifische Effekte der RNAi weitgehend minimiert sein, trotz der auftretenden Fehler in den Sequenzen.

Die Sequenz der HPPR in dem Überexpressionskonstrukt stimmt zu 100% mit der Original-Sequenz des offenen Leserasters der HPPR überein (Abb. 4.6.). Da anhand dieser Sequenz ein funktionales Protein heterolog exprimiert und charakterisiert wurde (Janiak, 2007), wird erwartet, dass auch in der Pflanze ein funktionales Protein gebildet wird.

Die Sequenz der RAS für die Überexpression in pflanzlichem Gewebe weist in der Basenabfolge gegenüber der Original-Sequenz zwei Punktmutationen auf (Abb. 4.8.; Basen 354 und 565). Eine davon ist jedoch eine stille Mutation und kommt in der Aminosäuresequenz nicht zum Tragen. Die zweite Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin bei Ser189. Es wurde vermutet, dass die Mutation in der Verbindungsschleife der zwei Domänen liegt. Abb. 4.9. zeigt jedoch, dass die Mutation sich drei Aminosäurereste vor der Schleife befindet. Da Prolin als Helixbrecher in der Sekundärstruktur von Proteinen bekannt ist, ist nicht gewährleistet, dass das Protein noch korrekt gefaltet wird und somit funktional ist. Da sich das Prolin jedoch an einem Übergang von einer Domäne zu der Schleife befindet, ist es auch möglich, dass der Aminosäureaustausch keine großen Konsequenzen für die Struktur des Proteins hat (Doenecke et al., 2005). Um das mutierte Protein auf seine Aktivität hin zu überprüfen, wäre

es möglich, die für das Überexpressionsexperiment verwendete RAS-Sequenz in einen Expressionsvektor einzubringen und heterolog zu exprimieren. Somit könnte festgestellt werden, ob eine gesteigerte RAS-Aktivität in der Pflanze überhaupt erreicht werden kann oder ob das Protein seine katalytische Funktion verloren hat. Da diese zweite Mutation jedoch erst später bemerkt worden ist, wurde mit der Erstellung von transgenem Pflanzenmaterial mit dieser mutierten RAS-Sequenz fortgefahren.

5.2. Test-Transformationen

Um die bestmögliche Kombination für die Erstellung von Hairy Roots aus *Coleus blumei* herauszufinden, wurden Testtransformationen mit verschiedenen Pflanzenlinien und *Agrobacterium rhizogenes*-Stämmen durchgeführt. Dabei stellte sich anhand eigener Beobachtungen (Korrespondenz Anke Behrens) und der Transformationsraten heraus, dass der *Agrobacterium rhizogenes*-Stamm LBA15834 die höchste Transformationsrate aufwies und die überlebensfähigsten Hairy Roots hervorbrachte (siehe Kapitel 4.2.1.). Diese Ergebnisse finden sich auch in der Literatur für *Coleus blumei* bestätigt (Saleh und Thuc, 2009). Der *Agrobacterium rhizogenes*-Stamm LBA15834 gehört dem Agropin-Typ an, TR105 dem Mannopin-Typ (Van De Velde et al., 2003). Agropin-Typ Agrobakterien besitzen zwei getrennte T-DNAs auf dem Ti-Plasmid, genannt T_R und T_L . Die Übertragung von T_L ist essentiell für die Ausbildung von Hairy Roots und trägt die *rol*-Gene. T_R kodiert für Gene, die bei der Auxin-Biosynthese eine Rolle spielen (Winans, 1992) und deren Integration ins pflanzliche Genom nicht nötig ist, um Hairy Roots zu induzieren (Veena et al., 2007). Bekannterweise tragen Auxine im Gartenbau zur Stecklingsbewurzelung bei (z.B. Rhizopon® B mit 0,1% 1-Naphthyllessigsäure (NAA)) und regen in bestimmten Konzentrationen die Bildung von Adventivwurzeln an (Raven et al., 2000). Diese Wirkung der Auxine trägt zu einer zusätzlichen Optimierung der Hairy Root-Bildung bei, da die infizierte Pflanze durch die *rol*-Gene nicht nur sensibler auf Auxin reagiert, was ebenfalls zur Bildung von Adventivwurzeln beiträgt (Winans, 1992; Visser et al., 1996), sondern die T_R -Gene vermehrt Auxin produziert. Durch diese zweifache Beeinflussung des Auxin-Haushaltes sind die Agropin-Typ Agrobakterien effektiver in der Induktion von Hairy Roots als andere Typen.

Die Hairy Roots der Testtransformation wurden verschiedenen molekularbiologischen Untersuchungen unterzogen und der Gehalt an Rosmarinsäure bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse sollte herausgefunden werden, welche Auswirkungen die HPPR RNAi-Konstrukte in den Hairy Roots haben und welche Transformationsereignisse die besten Ergebnisse liefern.

Als erstes wurden die Suspensionskulturen auf Kontaminationsfreiheit von Agrobakterien getestet, da weitere Untersuchungen durch die Anwesenheit von Agrobakterien beeinflusst werden könnten. Dazu wurde genomische DNA aus den Wurzelkulturen isoliert und über PCR das Agrobakterien-Gen *virC* amplifiziert. In Abb. 4.10. ist zu sehen, dass alle Kulturen bis auf AHR-1 kein Produkt aufweisen, also frei von Agrobakterien sind. Warum AHR-1 ein Produkt der richtigen Größe zeigt, ist nicht bekannt. Die Kultur zeigt keine offensichtliche Kontamination mit Agrobakterien, und es ließen sich auch keine Agrobakterien durch das Ausbringen von Hairy Roots auf YMB-Medium heranziehen. Durch Sequenzierung stellte sich heraus, dass es sich tatsächlich um ein Amplifikat von *virC* handelt und nicht um ein Falsch-Amplifikat passender Größe. Möglich wäre, dass *virC* mit der T-DNA zusammen übertragen wurde, da beide auf dem Ti-Plasmid liegen. Es ist bekannt, dass dieselben Ti-Plasmide nicht immer zu denselben Transformationsprodukten in der Pflanze führen (Thomashow, 1980). Es ist in seltenen Fällen auch möglich, dass DNA-Sequenzen des Ri-Plasmides übertragen werden, die sich hinter der „left border“ auf dem Plasmid befinden (Martineau et al., 1994; Ramanathan und Veluthambi, 1995). Da sich dort rein physikalisch die *vir*-Gene befinden (Moriguchi et al., 2000), ist es möglich, dass dieses Gen bei AHR-1 zusammen mit der T-DNA ins Pflanzengenom integriert worden ist. Mithilfe einer RT-PCR wurde festgestellt, dass *virC* exprimiert wird. Ob ein funktionales Protein translatiert wird, ist allerdings nicht bekannt. Es wurde jedoch entschieden, die *virC*-positiven Transformanten von weiteren Tests auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung, ob *virC* von versteckten Agrobakterien stammt oder tatsächlich ins Pflanzengenom integriert wurde, wäre die Amplifikation eines weiteren Agrobakteriengens, das auf dem Bakterienchromosom liegt und nicht auf dem Ri-Plasmid. Da jedoch nur *Agrobacterium tumefaciens* C58 sequenziert ist, wurde versucht ein *A. tumefaciens*-Gen für den Nachweis zu nehmen. Es stellte sich jedoch als *A. tumefaciens*-spezifisch heraus, und es konnte kein PCR-Produkt mit *A. rhizogenes* amplifiziert werden. Trotz persönlicher Korrespondenz mit Derek Wood (www.agrobacterium.org, ein Sequenzierungsprojekt für die verschiedenen Agrobakterienbiovare) war es nicht möglich, eine geeignete Sequenz für ein *A. rhizogenes*-Gen zur Primererstellung zu bekommen.

Die Hairy Roots wurden auf die Anwesenheit der eingebrachten RNAi-Expressionskassette hin überprüft. Dafür wurde ein Teil des 35S-Promotors aus pHANNIBAL durch PCR amplifiziert. Die AHR-Linien, die keine Expressionskassette tragen, sind negativ für ein 35S-PCR-Produkt. Alle HPPR RNAi-Linien sind positiv für ein PCR-Produkt des 35S-Promotors, sie tragen also die RNAi-Expressionskassette. Diese Linien sollten also ein RNAi-Konstrukt exprimieren und eine Unterdrückung der HPPR hervorrufen. Um dies festzustellen, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt, bei der die Volllänge der HPPR amplifiziert

wurde. Bei sämtlichen AHR-Linien ist ein HPPR-Produkt zu sehen, es wird also überall HPPR-mRNA gebildet. Die HPPR RNAi-Linien zeigen unterschiedliche HPPR-mRNA-Level. HR-A zeigt mit AHR-Linien vergleichbare Mengen an HPPR, die Linien HR-I, HR-L und HR-R zeigen im Vergleich zu den AHR-Linien geringere Gehalte an HPPR-mRNA. Bei diesen Linien ist die Funktion des RNAi-Konstruktes nur eingeschränkt wirksam. Die restlichen HPPR-RNAi-Linien zeigen kein HPPR-Amplifikat, dort ist also das HPPR RNAi-Konstrukt wirksam und verringert die Menge an HPPR-mRNA in der Pflanze bis auf nicht detektierbare Mengen (Abb. 4.13.). Die unterschiedliche Ausprägung des RNAi-Effekts ist in der Literatur mehrfach belegt (Wang et al., 2008; McGinnis et al. 2007). Welchen Effekt die unterschiedliche Unterdrückung letztendlich auf die Rosmarinsäurebiosynthese hat, muss anhand der Rosmarinsäureakkumulation in den einzelnen Hairy Root-Linien überprüft werden. Die erhaltenen Werte sind in Abb. 4.14. dargestellt. Die Graphen sind nach dem ursprünglich verwendeten Pflanzenmaterial aufgeteilt, um die Rosmarinsäuregehalte mit dem der sterilen Pflanzen zu vergleichen, die zur Induktion der Hairy Roots verwendet wurden. Die Rosmarinsäuregehalte sind in den AHR-Hairy Roots, den sogenannten Wildtyp-Transformationen, geringfügig höher als in den sterilen Pflanzen. Dies ist eine häufige Beobachtung, da die *rol*-Gene sich auf den Sekundärstoffwechsel fördernd auswirken können (Bonhomme et al., 1999; Bulgakov et al., 2004). Es ist jedoch auch das Gegenteil bekannt, und die Bildung gewisser Metabolite wird negativ beeinflusst (Bulgakov et al., 2005). Dies war in unseren Experimenten nicht der Fall. Der erhöhte Rosmarinsäuregehalt könnte jedoch auch der normale Gehalt in Wurzeln sein, da bei Untersuchungen von verschiedenen Pflanzenteilen von *Coleus blumei* festgestellt wurde, dass der Rosmarinsäuregehalt dort etwa um ein Drittel höher ist als in den anderen Pflanzenteilen (Szabo, 1993).

Die Rosmarinsäuregehalte der AHR-Linien stimmen weitgehend mit denen der sterilen Pflanzen überein. Hier stellte sich bereits heraus, dass die Pflanzenkultur ColV1 die höchsten Rosmarinsäuregehalte aufweist und hier eine mRNA-Level-abhängige Unterdrückung der Akkumulation am besten zu beobachten wäre.

Betrachtet man die Hairy Root-Abkömmlinge einer Pflanze miteinander, fällt bei Col V1 auf, dass die HPPR-RNAi-Linien HR-A und HR-L mit den Wildtyptransformationen vergleichbare Rosmarinsäure-Mengen aufweisen, die Kulturen HR-E und HR-G hingegen zeigen deutlich niedrigere Gehalte. Vergleicht man die Rosmarinsäuregehalte mit den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR, stellt man fest, dass HR-A und HR-L HPPR-PCR-Amplifikate aufweisen, HR-E und HR-G dagegen nicht. Bei Col V3 sind alle Rosmarinsäuregehalte in ähnlichen Bereichen, nur HR-K weist fast dreimal so viel Rosmarinsäure auf wie die Wildtyptransformation. Die Unterschiede zwischen den HR-Linien, die HPPR-PCR-Produkt aufweisen (HR-I) und den Linien, die kein Produkt zeigen (HR-C, HR-F, HR-H) ist kein

Unterschied zu sehen. Die Col V4-Abkömmlinge verhalten sich ähnlich. HR-R sticht, wie HR-K, durch eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Rosmarinsäure-Menge hervor. Es wäre möglich, dass die Ursache der Agrobakterienstamm TR105 ist, da nur diese zwei Kulturen von TR105 stammen, die restlichen Hairy Root-Kulturen entstanden durch LBA15834.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Pflanzenlinie Col V1 als Stammpflanze für die Transformationen gewählt und *Agrobacterium rhizogenes* LBA15834 als aufgrund seiner Transformationsrate.

5.3. RNAi- und Überexpressionsuntersuchungen

5.3.1. Molekularbiologische Untersuchungen der Hairy Root-Linien

Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.2. wurde die Kombination aus der Pflanzenlinie Col V1 und dem *Agrobacterium rhizogenes*-Stamm LBA15834 für die RNAi- und Überexpressionsuntersuchungen verwendet. Es konnten die in der Tabelle 4.3. aufgeführten Hairy Root-Linien als stabile Flüssigkulturen etabliert werden. Diese Flüssigkulturen wurden daraufhin anhand der Amplifikation des Agrobakteriengens *virC* auf die Abwesenheit der Agrobakterien überprüft. Alle verwendeten Kulturen wiesen kein PCR-Produkt für *virC* auf, waren also frei von Kontaminationen mit Agrobakterien. Dies ist relevant, da die Anwesenheit von Plasmid-tragenden Agrobakterien weitere molekularbiologische Untersuchungen verfälschen könnten. PCR-Untersuchungen, die auf Anwesenheit der Konstrukte prüfen, könnten falsch positiv ausfallen, da noch Plasmid-DNA aus den Agrobakterien vorhanden wäre. Zusätzlich sind Untersuchungen an kontaminierten Kulturen nicht aussagekräftig, da in den Pflanzen eventuell Abwehrmechanismen aktiviert sind (Simoh et al., 2009). Dadurch kann es zu einer Expression von Abwehrstoffen kommen, zu denen auch die Rosmarinsäure gehört (Petersen und Simmonds, 2003).

Desweiteren wurden die Kulturen sowohl mit 35S-Primern als auch mit *nptII*-Primern auf die Anwesenheit der ins Genom integrierten T-DNA mit den RNAi- bzw. Überexpressionskonstrukten überprüft. Mit den 35S-Primern konnten nur die RNAi- und Überexpressionslinien positiv nachgewiesen werden, da sie den 35S-Promotor aus pHANNIBAL tragen. Dies war auch der Fall bei den HPPR- und RAS-RNAi-Linien und bei den HPPR- und RAS-Überexpressionslinien. Sie waren alle positiv auf das eingebrachte Konstrukt. Mit dem *nptII*-Primern hingegen konnten zusätzlich die pART27-Kontrollen als positive Transformanten bestätigt werden, da hier das *nptII*-Gen aus dem pART27-Vektor amplifiziert wird. Für die „Wildtyp“-Transformationen ohne pART27-Plasmid und ohne pHANNIBAL-Expressionskassette waren beide Nachweise negativ.

Um unspezifische Effekte der *rol*-Gene auf das Pflanzenmaterial auszuschließen (Bonhomme et al., 1999; Bulgakov et al., 2004; Bulgakov et al., 2005), wurden die *rol*-Gene A, B und C durch PCR nachgewiesen. Die *rol*-Gene sind nötig, damit die Hairy Roots zustande kommen (Veena und Taylor, 2007), sie beeinflussen jedoch den Pflanzenmetabolismus. Daher sollten alle *rol*-Gene in den Pflanzen vorhanden sein, damit eventuelle Effekte auf die Rosmarinsäurebiosynthese bei allen Kulturen gleich ausgeprägt sind. Abb. 4.18. zeigt, dass in allen Kulturen *rolA*, B und C vorhanden sind, also alle Kulturen gleich durch die *rol*-Gene beeinflusst werden sollten.

Die mRNA-Level von HPPR, RAS und HPR1 wurden durch semiquantitative RT-PCR ermittelt. Sie dienten der Kontrolle über die Funktionsweise der RNAi- und Überexpressionstransformationen. Die Kontrollen ohne Vektor und mit pART27-Vektor ohne Expressionskassette zeigten zum Vergleich die „normalen“ Expressionslevel dieser drei Gene. Aktin wurde als interner Standard als Duplex-PCR mit amplifiziert, um eventuelle Fehler bei der vorangegangenen Quantifizierung festzustellen. Interne Standards sollten bestimmte Voraussetzungen erfüllen, wie z.B. eine konstante Expression in verschiedenen Geweben. Optimal wäre ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen. Aktin, sowie 18S rRNA und Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) kommen dem am nächsten (Applied Biosystems (Ambion), Technical Bulletin #151 http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_151.html). Die HPPR-mRNA-Level waren in den Linien LBA, pART27, RAS RNAi und 35S RAS vergleichbar. Drei der HPPR RNAi-Linien (1, 2, 5) zeigten verringerte HPPR-mRNA-Level gegenüber den Kontrollen, die HPPR RNAi-Linien 7 und 8 wiesen kein Amplifikat auf. Die 35S HPPR-Linien 3 und 5 zeigten gegenüber den Kontrollen deutlich höhere HPPR-Level, 35S HPPR 6 hingegen eine eher verringerte Menge. Das heißt, dass zwei der HPPR RNAi-Linien (7, 9) optimal auf RNA-Ebene herunter reguliert („silenced“) und zwei 35S HPPR-Linien (3, 5) überexprimiert sind (vgl. Abb. 4.19.). Bei den anderen Linien dieser Konstrukte müssen weitere Ergebnisse betrachtet und mit den semiquantitativen RT-PCR-Ergebnissen verglichen werden, um zu sehen, ob sie sinnvoll korrelieren.

Für die RAS war eine semiquantitative RT-PCR etwas schwierig durchzuführen, da eine Amplifikation der RAS erst ab 36 Zyklen zu sehen war. Dies ist für das PCR-Produkt Aktin nicht mehr im linearen Bereich der Amplifikation. In Abb. 4.20. ist zu sehen, dass die RAS-mRNA-Level der Linien LBA und pART27 in vergleichbaren Bereichen liegen. Die Amplifikat-Menge der HPPR RNAi-Linien hingegen scheint gegenüber den Kontrollen leicht erhöht zu sein. Die HPPR-Überexpressionslinien 35S HPPR zeigen hingegen ähnliche Mengen an RAS-mRNA wie die Kontrollen. Von den RAS RNAi-Linien ist nur in Linie 8 ein Produkt zu sehen, bei den anderen Linien (5, 6, 7, 10) nicht. Es zeigen also vier RAS RNAi-Linien optimales Silencing. Die RAS-Überexpressionslinien zeigen gegenüber den Kontrollen

verringerte RAS-mRNA-Level. Es konnte also keine Überexpression der RAS erzielt werden. Es scheint sogar der Fall der Cosuppression eingetreten zu sein und einen der RNAi ähnlichen Effekt erzielt zu haben. Dies ist ein bekanntes Problem für die Überexpression von Genen (Napoli et al., 1990). Sehr hohe Konzentration eines Transkripts im Cytoplasma kann zu dessen sequenzspezifischem Abbau führen (Que et al., 1997). Es wäre möglich, dieses Problem zu umgehen, indem man einen Promotor verwendet, der nicht so stark überexprimiert wie der 35S Promotor. Am besten wäre es, einen induzierbaren Promotor zu verwenden, um durch eine geringere Überexpression den Effekt der Cosuppression zu vermeiden (Que et al., 1997). Aus diesem Grund spielt es in diesem Fall kaum eine Rolle, dass die Sequenz der RAS einen Aminosäure-Austausch enthält, da ohnehin keine Überexpression zustande gekommen ist.

Die ermittelten mRNA-Level der peroxisomalen HPR1 sind in allen Linien in vergleichbarer, sehr geringer Menge vorhanden. Obwohl die HPR1 ein Enzym der Photosynthese ist und in Wurzeln deshalb nicht erwartet wird, decken sich diese Ergebnisse mit der Literatur, da die HPR1 auch in geringen Mengen in photosynthetisch nicht aktiven Geweben exprimiert ist (Wang et al., 2009). Das bedeutet aber auch, dass durch die HPR1 eventuell *in vitro* dieselbe Reaktion katalysiert wird wie durch die HPPR. Es allerdings nicht bekannt, ob die HPR1, so wie die cytoplasmatische HPR2 (siehe Kapitel 5.7.), das Substrat 4-Hydroxyphenylpyruvat wirklich akzeptiert. Die Sequenzen der HPR1 aus *Coleus blumei* und *Arabidopsis thaliana* sind zwar beide bekannt, wurden aber nicht als heterolog exprimiertes Enzym charakterisiert.

Zur Bestimmung der Anzahl der ins Genom integrierten RNAi- und Überexpressionskonstrukte wurden Southern Blots durchgeführt. Die abgeschätzten Kopienzahlen sind in Tabelle 4.4. aufgeführt. Es ist zu sehen, dass immer mehrere Kopien (2 bis 12) des Konstrukts in das Genom integriert wurden. Es ist nicht unüblich, dass mehr als nur eine Kopie der T-DNA an verschiedenen Stellen in das Pflanzengenom integriert werde (Slightom et al., 1985; Thomashow et al., 1980). Die Integration erfolgt meist zufällig über das gesamte Genom verteilt und kann sowohl in hochrepetitiven Regionen als auch in wenig repetitiven Regionen stattfinden, die jedoch meist AT-reich, vor allem aber T-reich sind. Bei *Arabidopsis* findet man T-DNA-Insertionen oft in Intronbereichen, Promotorregionen und 5'- und 3'- untranslatierten Regionen (Filipenko et al., 2007).

5.3.2. Kulturcharakterisierung zur Bestimmung eines Erntezeitpunkts

Die Kulturcharakterisierung der verschiedenen Hairy Root-Linien wurde durchgeführt, um einen geeigneten Erntezeitpunkt für die verschiedenen Messungen festzulegen. Es wurde Tag 12 als Erntezeitpunkt ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt genügend Pflanzenmaterial

für Messungen herangewachsen war (Minimum 1 bis 1,5 g Pflanzenmaterial), die Rosmarinsäureakkumulation ihren Höhepunkt erreichte, und vor allem die HPPR und die RAS ausreichende Aktivitäten aufwiesen. Die Aktivitäten der TAT und der PAL zeigen ihre höchste Aktivität zwar schon früher im Kulturverlauf (Tag 3 bis 9), doch weisen sie auch an Tag 12 noch eine ausreichende Aktivität für Messungen auf. Die Bestimmung der PAL und TAT-Aktivitäten war auch nicht das Hauptaugenmerk dieser Arbeit. Deshalb wurde der Erntezeitpunkt nach der HPPR- und vor allem der RAS-Aktivität gewählt.

Die Untersuchungen der verschiedenen Hairy Root-Linien wurden zur Evaluierung der Rosmarinsäurebiosynthese-Enzyme HPPR und RAS durchgeführt. Durch die Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob die heterolog exprimierten und charakterisierten Enzyme HPPR (Kim et al., 2004) und RAS (Berger et al., 2006) für die Rosmarinsäurebiosynthese spezifisch sind. Zusätzlich wäre es möglich, durch die RNAi und Überexpression der Gene Hinweise auf die Regulationsmechanismen zu finden.

Im Folgenden werden immer die gemittelten Werte der Ergebnisse von Kapitel 4.3.4 erörtert.

5.3.3. Rosmarinsäuregehalte der verschiedenen Hairy Root-Linien

Die Rosmarinsäuregehalte der verschiedenen Hairy Root-Linien vom zwölften Kulturtage sind in Abb. 4.34. zusammengefasst. Die Werte der LBA- und pART27-Kontrollen liegen um 1,3 bis 2 % Rosmarinsäure im Trockengewicht. Verglichen mit dem Ausgangspflanzenmaterial Col V1, dessen Rosmarinsäuregehalt bei etwa 0,8 % liegt, ist dieser Wert etwas erhöht. Die Ursache kann in der Transformation durch die Agrobakterien begründet liegen, da durch die Anwesenheit der übertragenen *rol*-Gene manche Sekundärmetabolite vermehrt produziert werden können (Bulgakov et al., 2004). Andererseits ist bekannt, dass Wurzelmaterial erwachsener Pflanzen gegenüber anderen Pflanzenteilen erhöhte Rosmarinsäuregehalte aufweisen (Szabo, 1993). Betrachtet man sich die Werte der HPPR RNAi-Linien, fällt auf, dass die Linien 1, 2 und 5 mit den Kontrollen vergleichbare Rosmarinsäuregehalte aufweisen. Die Linien 7 und 8 hingegen zeigen einen deutlich verringerten Gehalt an Rosmarinsäure von lediglich 0,2 bis 0,4 %; das ist etwa nur ein Zehntel bis ein Drittel des Rosmarinsäuregehalts der Kontrollen. Durch die RNAi der HPPR verringert sich der Rosmarinsäuregehalt. Die HPPR trägt offensichtlich zum Biosyntheseweg bei. Dass in den RNAi-Linien die Biosynthese nicht komplett ausgeschaltet wurde und noch immer geringe Mengen der Sekundärmetabolite produziert werden, ist in der Literatur vielfach belegt. Kaplan und Guy (2005) haben die β -Amylase in *Arabidopsis* durch RNAi herunterreguliert, konnten aber noch immer geringe Mengen an Maltose nachweisen. Coleman et al. (2008) machten RNAi-Untersuchungen der „4-Cumaroyl-CoA 3'-Hydroxylase“ (katalysiert die 3'-

Hydroxylierung der 4-Cumaroyl-Shikimat und -Chinat) in Pappel und stellten unterschiedliche Grade des Silencing in mRNA- und Lignin-Gehalt fest. Ding et al. (2009) versuchten, die Glutathion Reduktase in *Arabidopsis* durch RNAi herunterzuregulieren und erreichten eine Verringerung der Enzymaktivität um 30 bis 70 %. Deshalb wird die Methode der RNAi auch als „knock down“ und nicht als „knock out“ bezeichnet. Dies reicht jedoch meist aus, um Schlüsse aus den so gewonnenen Ergebnissen ziehen zu können. Bei den Überexpressionslinien der HPPR zeigen nur die Linien 3 und 5 einen höheren Rosmarinsäuregehalt von 2,5 bis 3 %. Dies entspricht einer Steigerung des Gehalts auf das 1,5- bis 2-Fache. Diese Steigerung des Gehaltes ist nicht sehr ausgeprägt, in der Literatur findet man Beispiele, in denen eine Steigerung um das 10- bis 1000-Fache für andere Sekundärmetabolite erreicht wurde (Moyano et al., 2003; Siebert et al., 1996). Vermutlich liegt hier ein unbekannter limitierender Faktor in der Rosmarinsäurebiosynthese vor, der nicht durch die Überexpression der HPPR aufgehoben werden kann. Deshalb konnte nur eine geringe Steigerung des Rosmarinsäuregehalts erzielt werden.

Die RNAi-Linien der RAS zeigen im Allgemeinen Werte, die kaum 1 % Rosmarinsäure im Trockengewicht erreichen, teils sogar darunter liegen, wie bei den Linien 5, 6 und 7. Diese Linien zeigen bei der semiquantitativen RT-PCR kein Amplifikat für RAS. Die beiden anderen Linien hingegen zeigen kleine Mengen an RAS-Amplifikat, jedoch weniger als die Kontroll-Linien. Dadurch ist zu sehen, dass die RAS-mRNA-Menge und die Rosmarinsäuregehalte in etwa korrelieren. Zu sehen ist dies auch an den RAS-Überexpressionslinien, die in der semiquantitativen RT-PCR verringerte Mengen an RAS-Amplifikat gezeigt haben. Diese Linien haben ebenfalls verringerte Rosmarinsäuregehalte von maximal 1 %. Obwohl die überexprimierte RAS einen Aminosäureaustausch in der Sequenz enthält, scheint dies bei der Expression keine Rolle zu spielen. Es ist jedoch anhand dieser Ergebnisse nicht zu sehen, ob nur die native RAS oder auch die überexprimierte RAS für die Reaktion verantwortlich ist. Vermutlich liegen beide Enzymformen vor. Sollte ein Enzym nicht funktionieren, sollten die Rosmarinsäuregehalte eventuell sogar noch niedriger ausfallen, wenn man sie mit den nur teilweise verringerten RAS-mRNA-Gehalten und den daraus resultierenden Rosmarinsäuregehalten vergleicht. Hier wird vermutet, dass entweder ein Gemisch der beiden RAS-Enzyme vorliegt, bei dem beide Enzyme funktional sind, oder nur das native funktionale Enzym. Da jedoch keine Überexpression der RAS auf mRNA-Ebene erreicht wurde, konnte folglich auch keine Steigerung des Rosmarinsäuregehalts erzielt werden.

5.3.4. TAT-Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien

Die Aktivitäten der TAT (Abb. 4.36.) schwanken vor allem bei den Kontroll-Linien LBA und pART27 stark. Die niedrigsten Werte liegen bei etwa 18 µkat/kg, die höchsten bei 35 µkat/kg.

Die Aktivitäten der konstrukttragenden Linien zeigen etwas weniger Schwankungen innerhalb ihrer Gruppen. Die TAT-Aktivitäten der RNAi-Linien HPPR und RAS, sowie der RAS-Überexpressionslinien befinden sich eher im unteren Bereich der Kontrollaktivitäten, während die HPPR-Überexpressionslinien sich mehr in den höheren Aktivitätsbereichen der Kontrollen bewegen. Herausstechend sind die niedrigen TAT-Aktivitäten der Linien RAS RNAi 8 und 10. Es ist zu beobachten, dass höhere Rosmarinsäuregehalte oft mit einer eher niedrigeren TAT-Aktivität einhergehen. Eine weitere auffällige Korrelation mit den Rosmarinsäuregehalten (Abb. 4.34.) konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da die TAT jedoch nicht spezifisch für die Rosmarinsäurebiosynthese ist, sondern auch an der Bildung der Tocopherole und Plastochinone beteiligt ist und eventuell eine Rolle beim Tyrosinkatabolismus spielt (Dixon und Edwards, 2006), ist es schwer festzustellen, ob die Unterschiede in der TAT-Aktivität mit der Rosmarinsäureakkumulation zusammenhängen. Möglich wäre es auch, dass erhöhte TAT-Aktivitäten mit Zellalterung in Verbindung stehen und dadurch Tocopherole vermehrt gebildet werden (Holländer-Czytko et al., 2005). Da die Hairy Root-Kulturen unterschiedlich schnell wachsen und damit auch unterschiedlich während der Kultur altern (Abb. 4.27.), wäre dies eine Möglichkeit, die variierenden TAT-Aktivitäten der Kontroll-Linien zu erklären. Da die Tocopherolgehalte jedoch nicht bestimmt wurden, kann ein Zusammenhang nicht bestätigt werden. Es wurden jedoch die Tocopherolgehalte in Hairy Roots von *Silybum marianum* Hairy Root-Kulturen während des Kulturverlaufs von Hasanloo et al. (2009) bestimmt. Die höchsten Tocopherolgehalte wurden in den ersten zwei bis drei Kulturtagen gemessen, danach nahm der Gehalt um 75 % ab. Dies würde mit den Werten der Charakterisierung übereinstimmen, da die TAT ihre höchste Aktivität an Kulturtag 3 hat (Abb. 4.30.). Daher ist es auch gut möglich, dass die TAT-Aktivität und die Tocopherolsynthese enger zusammenhängen als die TAT-Aktivität und die Rosmarinsäurebiosynthese.

Desweiteren ist auch nicht bekannt, ob eine für die Rosmarinsäurebiosynthese spezifische TAT existiert oder ob ein gemeinsamer Pool an 4-Hydroxyphenylpyruvat von einer oder mehreren TAT-Enzymen gebildet wird, welches dann in die verschiedenen Stoffwechselwege Eingang findet.

Zusätzlich ist die TAT vielfach durch Methyljasmonat induzierbar, was darauf hindeutet, dass die TAT durch unterschiedliche biotische und abiotische Stressfaktoren induziert wird, wie z.B. Verletzungen, starken Lichteinfall und Seneszenz, bei denen reaktive Sauerstoffspezies entstehen und damit Tocopherole als Antioxidantien zum Einsatz kommen (Antognoni et al., 2009). Bei der Kultivierung ist es nicht auszuschließen, trotz der gleichen Bedingungen für alle Kulturen, dass diese unterschiedlich auf eventuellen mechanischen Stress reagieren und deshalb die TAT-Aktivitäten mehr oder minder starken Schwankungen unterliegen.

Dass die TAT-Aktivität als Eingangsenzym nicht ebenfalls durch die RNAi von HPPR oder RAS vermindert wird wie es teilweise bei anderen Sekundärstoffwechselwegen beobachtet wurde (Verdonk et al., 2005; Kempe et al., 2009), kann an der starken Beteiligung der TAT im Primärstoffwechsel (Plastochinone) liegen. Falls es eine für die Rosmarinsäurebiosynthese spezifische TAT geben sollte, wäre es schwierig, ihre Aktivität von der Aktivität anderer TAT-Enzyme in Enzymrohextrakten aus Pflanzenmaterial abzugrenzen.

5.3.5. PAL-Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien

Auch die PAL-Aktivitäten weisen starke Schwankungen von 1,8 $\mu\text{kat/kg}$ bis 4 $\mu\text{kat/kg}$ innerhalb der Kontroll-Linien LBA und pART27 auf. Die Aktivitäten der Linien HPPR RNAi, 35S HPPR, RAS RNAi und 35S RAS liegen weitgehend ebenfalls in diesen Größenordnungen. Besonders niedrige Werte, im Vergleich zu den anderen Kulturen ihrer Linie, zeigen RAS RNAi 8 (1,9 $\mu\text{kat/kg}$) und 10 (1,5 $\mu\text{kat/kg}$), besonders hohe Werte die Kultur RAS RNAi 7 (5 $\mu\text{kat/kg}$) und 35S RAS 1 (6 $\mu\text{kat/kg}$). Es scheint sich auch hier, wie bei der TAT, die PAL-Aktivität nicht auf die Rosmarinsäureakkumulation der verschiedenen RNAi- und Überexpressions-Konstrukte auszuwirken. Auffällig ist jedoch, dass die Linien RAS RNAi 7 und 8 sowohl eine geringe PAL- als auch TAT-Aktivität aufweisen, jedoch auf Ebene der RAS-mRNA und Rosmarinsäure keinen vollständigen RNAi-Effekt erfahren. Vermutlich ist dies keine Auswirkung der RAS RNAi, sondern liegt in den Aktivitäten der TAT und PAL begründet, die hier aus unbekannten Gründen niedriger liegen. Im Fall der PAL wäre es möglich, dass diese durch die Anwesenheit ihres Reaktionsproduktes *t*-Zimtsäure gehemmt wird (MacDonald und D'Cunha, 2007). Es ist durchaus möglich, dass *t*-Zimtsäure in den RAS RNAi-Linien akkumuliert wird, wenn die Folgeverbindungen nicht weiter zu Rosmarinsäure reagieren. Bei Ermittlung der *t*-Zimtsäure-Gehalte aus gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial konnte jedoch bei keiner der Linien *t*-Zimtsäure nachgewiesen werden (Tabelle 4.5.). Ein Überschuss an nicht zu bestimmten Sekundärstoffen umgesetzten Zwischenverbindungen kann sich auf die Ligninzusammensetzung oder den Chlorogensäuregehalt auswirken (Blount et al., 2000; Coleman et al., 2008). Die Ligninzusammensetzung wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, und Chlorogensäure kommt in *Coleus blumei* nicht vor.

Die PAL-Aktivität korreliert laut Razzaque und Ellis (1977) mit der Rosmarinsäureakkumulation. PAL ist jedoch kein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese, sondern ist in Pflanzen das Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels (MacDonald und D'Cunha, 2007), der für die Synthese vieler Pflanzenverbindungen wie Ligninen und Flavonoiden verantwortlich ist. Die Expression der PAL ist ebenfalls stark vom physiologischen Status der Pflanze abhängig und wird durch verschiedene Stressfaktoren

aktiviert (Jones, 1984). Ihre Aktivitäten aus Enzymrohextrakten können deshalb aus verschiedenen, nicht nachvollziehbaren Gründen stark variieren.

5.3.6. HPPR- Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien

Die Aktivitäten der HPPR wurden nur für die Kontroll-Linien LBA und pART, sowie für die HPPR RNAi- und HPPR-Überexpressionslinien bestimmt. Die Aktivitäten der Kontrollen liegen bei 1 bis 2 $\mu\text{kat/kg}$. In diesem Bereich bewegen sich auch die Aktivitäten der HPPR RNAi-Linien. Eine Ausnahme bildet die Kultur HPPR RNAi 8, deren Aktivität bei 3,8 $\mu\text{kat/kg}$ liegt. Die Aktivitäten der Überexpressionslinien 35S HPPR sind gegenüber den Kontroll-Linien deutlich erhöht und erreichen Werte von beinahe 10 $\mu\text{kat/kg}$, also das Fünffache der Kontroll-Aktivitäten. Betrachtet man dazu die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR für HPPR (Abb. 4.22.), stellt man fest, dass die HPPR RNAi-Kulturen 1, 2 und 5 noch PCR-Produkt aufweisen, also mRNA von HPPR vorhanden ist. Es ist also, wie zu erwarten, eine HPPR-Aktivität zu messen, die mit den Kontrollen vergleichbar ist. Auch die Rosmarinsäuregehalte dieser Linien liegen in demselben Bereich wie die der Kontrollen (Abb. 4.34.). Es hat also kein bzw. nur sehr geringes Silencing stattgefunden. Dies ist jedoch eine normale Beobachtung bei der Anwendung der RNAi (Wang et al. 2008). Im Southern Blot (Abb. 4.23.) dieser Linie fällt auf, dass diese drei Linien ein gleiches Bandenmuster von etwa 8 Banden aufweisen. Es wäre möglich, dass hier drei Hairy Roots aus demselben Transformationsereignis ausgewählt wurden. Beim Ernten wurden mehrmals im Abstand von einigen Tagen von demselben Pflanzenmaterial neue Hairy Roots entnommen. Es ist möglich, dass in dieser Zeit aus demselben Transformationsereignis erneut eine Wurzel ausgewachsen war. Eine spätere „Aufteilung“ einer Ursprungswurzel in drei Kulturen ist auszuschließen, da auf jeder Platte immer nur eine Wurzel individuell gezogen wurde bis sie als Flüssigkultur angesetzt werden konnte. Durch die relativ hohe Anzahl der integrierten Kopien des HPPR-RNAi-Konstrukts, üblicher bei diesen Kulturen ist drei bis fünf, ist es möglich, dass diese Transformation ungewöhnlich verlaufen ist. Möglich wäre die Bildung von Konkameren (Castel et al., 1993) und ein daraus resultierender Verlust der optimalen Funktion der RNAi.

Die HPPR RNAi-Linien 7 und 8 zeigen normale bis erhöhte HPPR-Aktivitäten im Vergleich zu den Kontrollen. Beide Linien zeigen jedoch kein HPPR-Produkt in der semiquantitativen RT-PCR und weisen auch einen um etwa 60 % reduzierten Rosmarinsäuregehalt auf. Dass sich dies nicht im *in vitro*-Enzymtest mit Rohproteinextrakt widerspiegelt, könnte daran liegen, dass noch andere, nicht herunter regulierte Enzyme die im Enzymtest angebotenen Substrate zu pHPL umsetzen können. In Frage käme die HPR1, da HPR1 und HPPR/HPR2 *in vivo* die gleiche Reaktion katalysieren (Timm et al., 2008). Da die sehr stark mit der HPPR

verwandte HPR2 aus *Arabidopsis thaliana* ebenfalls pHP umsetzt (siehe Kapitel 5.7.), wäre es möglich, dass auch HPR1 dazu in der Lage ist. Die Nukleotidsequenz der HPR1 unterscheidet sich deutlich von der der HPPR (bzw. HPR2), wird also durch die RNAi nicht betroffen (Abb. 5.1.). Die Sequenzen für die HPR1 sind für *Coleus blumei* und *Arabidopsis thaliana* bekannt. Untersuchungen zur Substratspezifität der HPR1 wurden bis jetzt nicht durchgeführt, werden in Zukunft aber stattfinden. Durch RT-PCR konnte festgestellt werden, dass HPR1-mRNA in geringer Menge amplifiziert werden konnte (Abb. 4.22.), also Protein für eine mögliche Reaktion vorhanden sein könnte. Wie bereits in Kapitel 5.3.1. erwähnt, ist HPR1 auch in photosynthetisch nicht aktivem Gewebe zu finden (Wang et al., 2009). Da die HPPR-Aktivitäten ohnehin sehr gering sind, kann es sein, dass kleine Unterschiede in den Aktivitäten durch die verwendete Methode nicht festgestellt werden können. Die verwendete HPLC-Methode an sich ist für den Nachweis des pHPL nicht optimal geeignet, da das im Überschuss zugegebene Substrat pHP ebenfalls ausgeschüttelt wird und die Detektion des pHPL stören kann (Weitzel, 2009).

Anhand von Southern Blots wurde festgestellt, dass mit der für die RNAi verwendeten Sequenz nicht spezifisch nur ein Gen detektiert wird (Kapitel 4.5.), sondern mehrere. Daher kann man nicht mit Bestimmtheit sagen, ob die von Kim et al. (2004) isolierte HPPR wirklich an der Rosmarinsäurebiosynthese beteiligt ist. Es könnte auch eines der zusätzlich von der RNAi betroffenen, noch nicht bekannten Gene/Proteine für die verringerten Rosmarinsäuregehalte verantwortlich sein.

Interessant wäre es zu sehen, ob durch die Reduktion der Rosmarinsäurebiosynthese das eventuell überschüssige pHP Einfluss auf die Tocopherolbiosynthese hat und vermehrt Tocopherole gebildet werden. Da die Wurzeln keine Photosynthese betreiben, wird vermutet, dass ein Überschuss nicht in die für die Photosynthese notwendige Plastochinon-Synthese einfließt. Es ist aber auch möglich, dass bereits vorher eine Regulation stattfindet und nur so viel pHP gebildet wird wie es für die Tocopherol-Synthese nötig ist, auch wenn hier keine Unterschiede diesbezüglich in der TAT-Aktivität beobachtet werden konnten. Da die TAT jedoch hauptsächlich stressbedingt induziert ist (Antognoni et al., 2009), wird auch nicht erwartet, dass eine Regulation durch die Rosmarinsäurebiosynthese stattfindet.

Die Überexpression der HPPR ist sowohl auf mRNA-Ebene, in der erhöhten Enzymaktivität als auch dem gesteigerten Rosmarinsäuregehalt zu beobachten. Es wurde durch die Überexpression der HPPR also eine vermehrte Rosmarinsäureakkumulation erreicht. Allerdings ist die Korrelation von Enzymaktivität, die auf das Drei- bis Fünffache erhöht ist, und dem Rosmarinsäuregehalt, der lediglich um ein Drittel höher liegt als bei den Kontrollen, nicht ganz übereinstimmend. Aufgrund der Enzymaktivität würde man einen höheren Gehalt an Rosmarinsäure erwarten. Limitierende Faktoren sind dabei vermutlich die nachfolgenden Enzyme bzw. die von L-Phenylalanin ausgehende Menge an Substrat für die weiteren

Reaktionen. Dies bedeutet jedoch auch, dass die HPPR-Aktivität und die von ihr gelieferte Produktmenge kaum Einfluss auf die anderen Enzyme der Rosmarinsäurebiosynthese hat. Diese Vermutung wird zusätzlich von den Ergebnissen der Supplementationsversuche (Kapitel 4.3.6.) unterstützt, da eine Zufütterung der Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin keinen Einfluss auf die Rosmarinsäuregehalte der verschiedenen Hairy Root-Linien hat. Also ist auch der Überschuss von Ausgangsverbindungen kein regulatorischer Faktor für die Rosmarinsäurebiosynthese.

45.6% identity in 1026 residues overlap; Score: 1629.0; Gap frequency: 8.7%

Col_HPR1,	47	ACAGAGTTGTTAGCACCAAGTCTATGCCGGGAACTCGATGGATCAATCTCTTGGTTGATC
Col_HPR2_H	1	ATGGAGGCGATTG--GCGTTTGTATGATGTG--CCCGATG-AGCACCTACTTGGA-GCAA
		* * * * *
Col_HPR1,	107	AAGATTGCCGT-CTAGAAATTTGCACGGAGAAGAAACTATACATCTGTTGAAGATATC
Col_HPR2_H	55	GAGCTTGACAAGCGGTTCAAGCTCTTTCGTTACTGGACTCAGCCGGCGCAGCGCACTTC
		* * * * *
Col_HPR1,	166	ATTCTTTGATTGGGAATAAGTGTGATGGAGTTATTGGTCAGTTGACTGAGGATTGGGG
Col_HPR2_H	115	CTCGCTCTGCAGCCGAGTCTATCCGCGGTGGTTGGGAATT CGAACGCCGTGCCGAT
		* * * * *
Col_HPR1,	226	GAGAAGTTGTTTTCTGCATTGAGCAGAGCTGGAGGGA-CGGCATTGACCAACATGGCTGT
Col_HPR2_H	175	GCTGAGTTGATCGACGCACTGC-CGAAACTGGAGATTGTGTCGAGCTTTAGCGTGGGTCT
		* * * * *
Col_HPR1,	285	CGGATACAACAACGTTGATGTCGATGCTGTAACAAACATGGGGTTGCTGTTGGAACAC
Col_HPR2_H	234	-GGATAAGGTTGACTTGATCAAG-TG---TGAGGAGAAGGGGTTAGGGTTACCAACAC
		* * * * *
Col_HPR1,	345	ACCTGGAGTGTGACAGAACTACAGCAGAGTTAGCTGCATCACTATCTTTAGCAGCAGC
Col_HPR2_H	288	GCCCGATGTGCTGACGGATGACGTCGGGATTGGCGGATCGGGTTGATTTGGCGGTTTT
		* * * * *
Col_HPR1,	405	TAGAAGAATTGTTGAAGCTGATGAGTTCAATGAGGGCTGGCTTGTATGATGGATGGCTTCC
Col_HPR2_H	348	GAGGCGGATTGTGAGTGTGATAAGTATGTGAGGAGAGGGCGGTG-GAAATTTGGAGACT
		* * * * *
Col_HPR1,	465	TCATCTTTTGTAGGGAACCTTA-CTCAAGGGACAACTGTTGGAGTGATCGGAGCTGGTC
Col_HPR2_H	407	TCAA-----GTTGACGACTAAGTTTCAGCGGTAAAGAGTTGGCATCATAGGATTGGGCA
		* * * * *
Col_HPR1,	524	GCATAGGATCTGCCTATGCAAGAATGATGGTTGAAGGGTTCAAAATGAACCTTAATCTACT
Col_HPR2_H	461	GAATCGGGTTAGCAGTTGCT-GAGCGA-----GCAGAG-----GCATTGAT-----
		* * * * *
Col_HPR1,	584	ACGATCTCTACCAGTCCACTCGTCTGGAGAAGTTCGTGACAGCTTATGGTCAGTTCTTTCG
Col_HPR2_H	502	-----TGTCGAATCA-----GTTACTTTTCAAGATC-----CAAGA
		* * * * *
Col_HPR1,	644	AAGCCAACGCGGAGCAGCCAGTCACGTGGAAACGGGCTTCATCCATGGATGAGGTGCTGC
Col_HPR2_H	533	AACCCAACA-CAAACTACACATACTATGGCAGCG---TTGTAGAATTGGCGTCAACAGT
		* * * * *
Col_HPR1,	704	GAGAGGCTGATGTGATAAGTCTTACCCCGTGTCTCGATAAAACGACCTATCATCTCGTCA
Col_HPR2_H	589	GACATCCTA--GTCGTAGCATGTCCCCTGACTCCAGAAACAAC-TCATATTATCAA-TCG
		* * * * *
Col_HPR1,	764	ACAAGGAGAGGCTGGCGAAGATGAAGAAGGAAGCCATCTGGTGAACGACGAGGGGCG
Col_HPR2_H	645	AGAAGTAATCGATG-CTCTGGGTCCAAAGGGAG---TTCTCATCAACATTGGAAGGGGAC
		* * * * *
Col_HPR1,	824	CGTTTATTGATGAGGTAGCTCTAGT-TGAGCACTTGAAACAAAATCCTATGTTTCGAGTT
Col_HPR2_H	701	CTCATGTTGATGAGCCGAACTGGTGTCTGCTCTTGTGG-AGGGCCGTCTGGGTGGCGCT
		* * * * *
Col_HPR1,	883	GGCCTTGATGTCTTTGAGGATGAGCCATACATGAAGCCCGGCTCGAAAAGATGAAGAAT
Col_HPR2_H	760	GGTCTTGATGTATTGAAAGGGAACAGAGTACCGGAGAAGCTCTTCGCTCTGGAAT
		* * * * *
Col_HPR1,	943	GCTATAATTGTGCCTCACATAGCCTCTGCTTCAAAGTGGACTCGTGAAGGAATGGCGACG
Col_HPR2_H	820	GTGTCTCTGTGCCACATGTAGGAGTGGCACCCTGGAAACGCGTAAAGTGATGGCTGAT
		* * * * *
Col_HPR1,	1003	CTCGTCACTCAATGTTTGGGAAAAATTAAAGGATATCCGATTGGGGTGATCCCAAC
Col_HPR2_H	880	CTTGTCGTGCGAAACTTGAAGCTCACTTCTCCGGCAAGCCTCTCT---TAACCTCCAGT
		* * * * *
Col_HPR1,	1063	AACGTG
Col_HPR2_H	936	AGTTTG
		* **

Abb. 5.1.: Sequenzvergleich von HPR1 mit HPPR (HPR2) aus *Coleus blumei*. Der Bereich für das RNAi-Konstrukt ist rot/fett markiert.

5.3.7. RAS-Aktivität der verschiedenen Hairy Root-Linien

Die RAS-Aktivitäten, wie alle gemessenen Enzymaktivitäten, variieren innerhalb der Kontroll-Linien stark von 200 bis 400 $\mu\text{kat/kg}$. Die Aktivitäten der konstrukttragenden Linien hingegen bewegen sich weitgehend in den Bereichen von 400 bis 600 $\mu\text{kat/kg}$, sind also den Kontrollen gegenüber erhöht. Es wurde jedoch erwartet, dass zumindest bei den RAS RNAi-Linien eine deutlich verringerte Aktivität zu finden ist, da zumindest die Linien RAS RNAi 5, 6 und 7 bei der semiquantitativen RT-PCR kein Produkt lieferten, also kein RAS-Enzym vorhanden sein sollte. Warum dennoch RAS-Aktivität zu messen ist, ist nicht bekannt. Der verringerte Rosmarinsäuregehalt wäre möglicherweise noch auf einen Abbau der Rosmarinsäure in der Pflanze erklärbar.

Die Hydroxycinnamoyltransferasen (HCT) des Phenylpropan-Stoffwechsels, genauer gesagt der Ligninbiosynthese, sind ebenfalls BAHD-Acyltransferasen. Aus *Coleus blumei* ist eine Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase (HST) bekannt. Sie weist keine RAS-Aktivität auf, doch sie besitzt eine Identität von 65,7 % auf Nukleotidebene mit der RAS (Abb. 5.2.). Es wäre möglich, dass sie ebenfalls durch den RNAi-Effekt betroffen ist und dadurch der ganze Phenylpropanstoffwechsel beeinflusst wird. Dies könnte anhand von semiquantitativer RT-PCR geklärt werden. Es wurde jedoch bei der Wahl der RNAi-Sequenz darauf geachtet, dass das DFGWG-Motiv, ein in BAHD-Acyltransferasen hoch konserviertes Motiv, nicht enthalten ist (Abb. 2.3.). Aus *Coleus blumei* wurde jedoch eine weitere partielle Nukleotidsequenz isoliert, die starke Ähnlichkeit mit der RAS besitzt. Da jedoch noch keine Charakterisierung dazu durchgeführt wurde, ist nicht bekannt, ob es sich um eine weitere funktionelle RAS handelt. Es ist auch nicht bekannt, ob diese RAS durch die RNAi betroffen ist oder nicht. Auf jeden Fall ist es wahrscheinlich, dass mehr als eine RAS in *Coleus blumei* existiert, allein aufgrund der amphidiploiden Natur der Pflanzen. Wenn dies der Fall ist, dann ist es unmöglich, eine bestimmte RAS-Aktivität aus dem Enzymrohextrakt zu bestimmen. Die in unseren Versuchen gemessene RAS-Aktivität könnte dann von der „alternativen RAS“ herkommen.

Die ebenfalls erhöhten RAS-Aktivitäten der 35S HPPR-Linien ließen sich durch eine tatsächlich erhöhte RAS-Aktivität erklären, da hier eine vermehrte Produktion von Rosmarinsäure stattfindet. Dies würde jedoch auch bedeuten, dass die HPPR bzw. deren Katalyseprodukt pHPL in geringem Maße regulatorisch auf die RAS-Expression wirken. Auf mRNA-Ebene konnte dies jedoch nicht eindeutig bestätigt werden (Abb. 4.20.). Bei den

65.7% identity in 1307 residues overlap; Score: 4709.0; Gap frequency: 2.8%

Col_RAS,	1	ATGAAGATAGAAGTCAAAGACTCGACTATGATAAAGCCGTCGGCGGAGACGCCGGGGGG
Col_HST,	1	ATGAAATCCACGTGAGAGATTCAACGCTGTCGGCCGTCGGCGGACGCCGGCCGTC

Col_RAS,	61	AGTTTGTGGCTCTCAAATTTGGACTTGTGTGCGCGGCAACTACCACACCTCAGCGTG
Col_HST,	61	AGCCTTTGGAATTCCAATGTTGACTTGGTGTGCC---CAATTTCCACACCCCAAGCGTC
		** * * * *
Col_RAS,	121	CACCTTACAGCCACGACGGCTCCGACAACTCTTCGACGCGCGGGTTGAAGGAGTCG
Col_HST,	118	TACTTCTACCGCCCTCCGGGCGGACAACTCTTCGACACGGCGGTGATGAAGCGCGG

Col_RAS,	181	CTCAGCCGAGCTCTGGTTGAGTTCTACCCCTACGCGGGGAGGTTGAAGCTGAACGCGAAC
Col_HST,	178	CTCGGTGCGGCGTGTGTCTTTCTACCCCATGGCAGGAGGCTGAAGAGGGATGAAGAT
		*** * * * *
Col_RAS,	241	CGCC---TCGAGATCGACTGTAAACAACGAGGGGTGCTGTTGGTGGAGCGGAGTGCGAC
Col_HST,	238	GGCGGGTTGAGATCGACTGCAACGCGAGGGAGTGCTGTTTGTGGAGCGGAGTCCGAC
		* * * * *
Col_RAS,	298	GGCGGTTGGATGAGCTCGGCGACTTCGCCCCCGCCGAGCTCAACC---TCATCCCC
Col_HST,	298	GGCAGGTTGACGATTACGGCGATTTTGCCTCTTTGGAGCTCCGCGCGCTCATTCG
		*** * * * *
Col_RAS,	355	AAAGTGGATTATTCTCGAGGA ATTTCACATACCTCTCATGGTTTTTCAGCTAACTCGC
Col_HST,	358	GCTGTGGATTATTCTCAGGAATATCGGCTTACCCGCTGCTGATTGAGGTTACATTT

Col_RAS,	415	TTCAAATGCGCGGAGTCGCTCTAGCGCTCGCAAACGAGCACCACTTATCCGACGGCGTC
Col_HST,	418	TTCAAATGCGGAGGTGTTCTTAGCGCTTGAATGCAGCACCAACGAGCGAGGATTT

Col_RAS,	475	GCGGCCCTCCACTTCATCAACACATGGGCCACTCAGCCGAGCGCCCGCCCTACC
Col_HST,	478	TCGCGCTTCACTTCATCAATACATGGTCCGA--TATGGCTC-GTGGACTGGACATACC
		*** * * * *
Col_RAS,	535	CCGCTGCGCACTTCGACCGGAGCTCCCTCTCCGCTCGCAACCCACCGCAGCGCAGTTC
Col_HST,	535	CTCCGCGCTTCATAGACCGGACCTTCTCTCTGCGGTGATCCCGCTCAGCGCGAGTTC
		* * * * *
Col_RAS,	595	AGCCACGCGGAGTACCAGCCCTCCCTCCACTCTCGAAAAACCTCTTCCCCACACCGACATC
Col_HST,	595	AAGCAGGTGGAGTACCAGCCCTCCAGC-CATGAAAACCTACGAACAGGTGAAACA--
		* * * * *
Col_RAS,	655	GCCCACTCCCGGTTCAAGCTCACCGCGACCACTCAACTCCCTCAAGTCCAAATTCAAA
Col_HST,	652	GTTGTCTCCATATTCAAGCTCACCAAGGATCAGCTCACAACCTTTAAAGCCAAAGTCAAG
		* * * * *
Col_RAS,	715	ACGCCCCCGCGACGCGCGCGCGCAAACTCTACAGCACGTTGAGGTTCTTGCGCGC
Col_HST,	712	-----GAGGATGGCAACACCA--CTTACAGCTCTACGAGATGCTCTCAGGC
		* * * * *
Col_RAS,	775	CATATCTGGCGAGCGTCTGCATCGCCCGCGCTGCGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTC
Col_HST,	760	CACGTATGCGCTGCACTTGTGGCTGCTGCTGCGCGAAGAGCAAGAGACTAAGCTG
		** * * * *
Col_RAS,	835	CACATCCCTTCGACGGCGCGGAGGCTGCAGC-----TGCGCGCGGATTCTTCGCG
Col_HST,	820	TACATAGCTACTGACGGCGGTCCAGGCTGCAGCCTCAACTCCACAGGCTACTTCGCG
		*** * * * *
Col_RAS,	889	AACGCCACTTCTTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGCGAGATCGAGTCGAACCTGCTG
Col_HST,	880	AACGTGATCTTCACAGCCACGCCACTTGCCGTGCGCGGGACCTAGGATCGAAGCCAGTG
		*** * * * *
Col_RAS,	949	AATTACGCGGTGCGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGCTGGATGAGGACTACCTGCGA
Col_HST,	940	TGGTATGCTGCAAGTAAATCCACGACGATTAGCCGAATGGACAACGACTACTTGAAG
		* * * * *
Col_RAS,	1009	TCGTGCGATCGATTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTGGCGCAGGGAGCTCAC
Col_HST,	1000	TCAGCTCTGGATTCTTGGAGCTGCAGCCTGATCTAAGGCACCTGCTCCGAGGAGCTCAC
		** * * * *
Col_RAS,	1069	AGTTTCAGGTGCCCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTGCCGATTACAGCGG
Col_HST,	1060	ACTTTTAGGTGCCGAATCTTGGTATAACAGTTGGGTAGGCTTCTATACATGATGCT
		* * * * *
Col_RAS,	1129	GATTTCGGGTGGGGGAAGCGGTGTATATGGGGCGTGGCGGCGC--CGTTTGAAGGGA
Col_HST,	1120	GACTTTGGGTGGGTAGCCGATCTTATGGGGCG--GGCGCATAGCTACGAGGGCC
		** * * * *
Col_RAS,	1187	AGAGCTACCTTCTGCCTAACCCGAAAAAGATGGCAGCTTGTTCGTCTCCATCACTCTGC
Col_HST,	1178	TGAGCTTCGTGCTGCCAGTCCACAAACGACGGAGCTTATCTGTGGCAATATCCCTGC

Col_RAS,	1247	ATAAGCAACACATGGAGAGATTGAGAAGTTGTTTATGAGATTGA
Col_HST,	1238	AGGCAGACATAGAACTCTTGAGAAGCTGCTCTATCAGATTGA
		* * * * *

Abb. 5.2.: Nukleotidsequenzvergleich von RAS und HST aus *Coleus blumei*.

HPPR RNAi-Linien konnte im Vergleich zu den Kontroll-Linien geringfügig mehr RAS aus cDNA amplifiziert werden. Dieses Ergebnis würde zu der erhöhten RAS-Aktivität passen. Eventuell wird RAS auch durch das Endprodukt Rosmarinsäure reguliert, da bei einer geringeren Menge an Rosmarinsäure vermehrt RAS-Aktivität zu messen ist, vielleicht ein Kompensationseffekt der Pflanze, mehr 4-Cumaroyl-CoA aus dem Phenylpropanstoffwechsel abzuziehen. Da Rosmarinsäure ein in der Vakuole auf Vorrat gespeicherter Abwehrstoff ist, wäre dies eine durchaus nachvollziehbare Regulation, um so den Rosmarinsäuregehalt konstant zu halten.

5.4. Fütterung von Vorstufen und mögliche Akkumulation von Zwischenstufen

Die Überexpressionslinien von HPPR und RAS wurden im Medium mit den Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin supplementiert, um zu sehen, ob dies Auswirkungen auf den Rosmarinsäuregehalt hat. Bei der Bestimmung des Rosmarinsäuregehalts konnte kein Unterschied zwischen den Kontroll- und den Test-Kulturen festgestellt werden (Abb. 4.44.). Dies lässt darauf schließen, dass die fehlenden oder geringen Überexpressionseffekte nicht auf einen Mangel an Vorstufen zurückgeführt werden kann und dass die beteiligten Enzyme nicht durch die Anwesenheit der Ausgangsverbindungen reguliert werden.

Exemplarisch wurden von jeweils einer Linie der Kontrollen und konstrukttragenden Linien die möglicherweise angehäuften Zwischenprodukte der Rosmarinsäurebiosynthese bzw. deren Derivate bestimmt (Tabelle 4.5.). Es konnte bis auf Kaffeesäure keine der Vorstufen der Rosmarinsäure gemessen werden. Eine Korrelation zwischen dem Rosmarinsäuregehalt und dem Kaffeesäuregehalt konnte nicht festgestellt werden (Abb. 4.43.). Es werden also keine Zwischenprodukte akkumuliert und auch keine Derivate aus vermehrt vorhandenen Zwischenprodukten synthetisiert.

Der HPLC-Nachweis von pHPL gestaltete sich schwierig. Eine definitive Aussage über die Akkumulation von pHPL kann daher nicht getroffen werden.

5.5. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aus HPPR und RAS RNAi- und Überexpressionsexperimenten

Die RNAi hat in einigen Kulturen (HPPR RNAi 7 und 8; RAS RNAi 5, 6 und 7) gezeigt, dass durch Silencing der entsprechenden Rosmarinsäurebiosynthesenzyme der Gehalt an Rosmarinsäure deutlich reduziert werden konnte. Diese Linien zeigten auch auf mRNA-Ebene ein Silencing. Die Linien HPPR RNAi 1, 2 und 5 sowie RAS RNAi 8 und 10 zeigten

diesen Effekt in weniger ausgeprägter Form. Die Überexpression kam nur bei der HPPR zustande und konnte anhand der vermehrten mRNA, der gesteigerten Enzymaktivität und dem erhöhten Rosmarinsäuregehalt bestätigt werden. Bei den RAS-Überexpressionslinien kam es durchweg zur Cosuppression. Es konnte also nicht beobachtet werden, welchen Effekt eine Überexpression der RAS auf die Biosynthese hat. Es trat ein ähnlicher Effekt wie bei den nicht vollständig gesilencierten RAS RNAi-Linien auf, was sich in einem gegenüber den Kontrollen leicht verminderten Rosmarinsäuregehalt widerspiegelt.

Bei den Überexpressionslinien der HPPR zeigen nur die Linien 3 und 5 einen deutlich höheren Rosmarinsäuregehalt von 2,5 bis 3 %. Dies entspricht einer Steigerung des Gehalts auf das 1,5- bis 2-Fache. Vergleicht man dies mit den mRNA-Gehalten, ist jedoch zu sehen, dass die Transkript-Menge deutlich mehr ist als nur das Doppelte der normalen mRNA-Menge. Der limitierende Faktor hierfür könnte in der RAS-Aktivität begründet sein, da sich ihre mRNA-Menge nicht mit erhöht und auch ihre Aktivität in Proteinrohextrakten nicht höher wird. Dies bedeutet auch, dass die normale RAS-Aktivität nicht am Limit ihrer Kapazität arbeitet, sondern durchaus auch mehr Produkt bilden könnte. Regulatorisch bedeutet dies, dass eine vermehrte HPPR-Menge und damit einhergehendes Katalyseprodukt, das 4-Hydroxyphenyllaktat, keinen regulatorischen Einfluss auf die RAS hat. Es wäre möglich, dass der limitierende Faktor die Ausgangsprodukte der Rosmarinsäurebiosynthese sind, die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Da aber bei Supplementationsexperimenten die Ausbeute an Rosmarinsäure nicht erhöht werden konnte, scheint auch dies nicht der limitierende Faktor zu sein. Vermutlich sind an der Regulation die Enzyme beteiligt, die das L-Phenylalanin zu 4-Cumaroyl-CoA umsetzen. Hier wäre es interessant zu sehen, ob sich der Rosmarinsäuregehalt durch Elicitierung der Überexpressionslinien deutlicher steigern ließe.

5.6. Charakterisierung der rekombinanten cytosolischen Hydroxypyruvat Reduktase (HPR2) aus *Arabidopsis thaliana*

Die Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) ist ein Enzym der Photorespiration. Die HPR ist beteiligt an der Rückführung des C2-Körpers 2-Phosphoglycolat in den Calvin-Zyklus, das bei der Sauerstoff-Fixierung der RubisCO entsteht und das Produkt einer Nebenreaktion der Kohlendioxidfixierung der Photosynthese ist. Aus *Arabidopsis thaliana* sind zwei HPR-Enzyme bekannt, ein peroxisomales (HPR1, Mano et al., 1997) und ein cytosolisches (HPR2, Timm et al., 2008). Im Gegensatz zu *Cucurbita sc. cv. Kurolawa Amakuri Nankin*, bei dem beide Enzyme durch alternatives Spleißen derselben pre-mRNA zustande kommen, sind bei *Arabidopsis thaliana* zwei verschiedene Gene der Ursprung für die beiden HPRs

(Mano et al., 1997 und 1999). Die beiden HPRs aus *Arabidopsis* weisen auch nur 44,7% Identität in ihren offenen Leserastern der cDNA und 30,5 % auf Proteinebene auf. Beide gehören jedoch der Familie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen an (Sequenzvergleiche mit der InterPro Datenbank). Sie zeigen das bekannte GxGxxG-Motiv für die Bindung des Cosubstrates sowie andere hochkonservierte Aminosäuren (Abb. 5.3.).

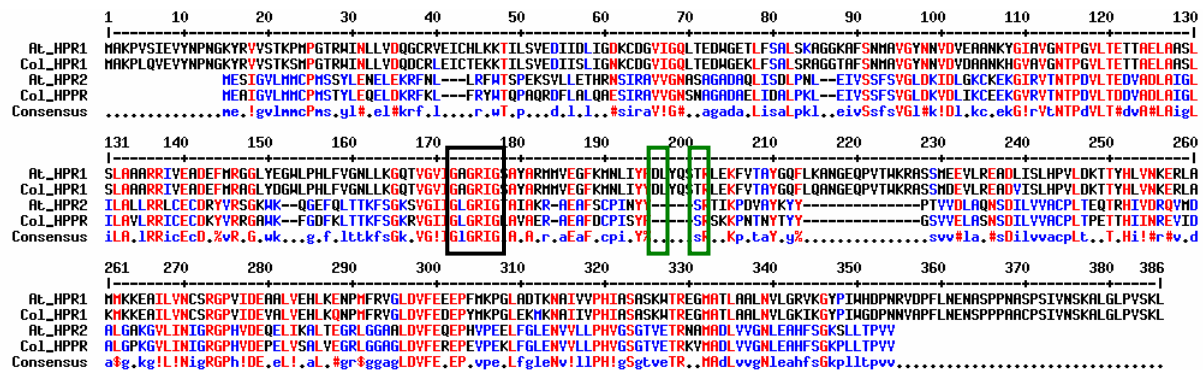


Abb. 5.3.: Alignment der Proteinsequenzen verschiedener D-Isomer-spezifischer 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen. At_HPR1 (HPR1 aus *Arabidopsis thaliana*; NP_176968, NCBI); At_HPR2 (HPR2 aus *Arabidopsis thaliana*; AT1G79870.1, tair); Col_HPR1 (HPR1 aus *Coleus blumei*; AT1G68010.1, tair); Col_HPR2_HPPR (HPPR aus *Coleus blumei*); (Alignment mit MultAlin: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). Das GxGxxG-Motiv ist durch einen schwarzen Kasten markiert. Die Aminosäuren an Stelle 174 der HPPR sind mit einem grünen Kasten markiert; bei Serin ist das Protein NADPH-abhängig, bei Asparagin NADH-abhängig.

In Abb. 5.4 ist auch zu sehen, dass die Proteinsequenzen der *Arabidopsis thaliana* HPR2 (Timm et al., 2008) und der *Coleus blumei* HPPR (Kim et al., 2004) ähnlich sind und eine Identität von 76,7% aufweisen. Die von Kim et al. klonierte HPPR ist bereits charakterisiert, und es wurde von Janiak (2007) die Struktur aufgeklärt. Aus diesem Grund wurde die HPR2 aus *Arabidopsis thaliana* in dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert, um sie in ihrem enzymatischen Verhalten vergleichen zu können. Die HPPR von Kim et al. (2004) aus *Coleus* wurde der Rosmarinsäurebiosynthese zugerechnet. Doch bereits bei der Charakterisierung des rekombinanten Proteins durch Janiak (2007) wurde vermutet, dass die HPPR kein spezifisches Enzym der Rosmarinsäurebiosynthese ist, da die Photorespirations-Substrate Hydroxypyruvat und Glyoxylat deutlich kleinere K_m -Werte aufwiesen als 4-Hydroxyphenylpyruvat und 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat, die Substrate der Rosmarinsäurebiosynthese.

76.7% identity in 313 residues overlap; Score: 1254.0; Gap frequency: 0.0%

At_HPR2,	1	MESIGVLMMPSSYLENELEKRFNLLRFWTSPEKSVLLETHRNSIRAVVGNASAGADAQ
Col_HPR2_H	1	MEAIGVLMMPSTYLEQELDKRFKLFRTWTQPAQRDFLALQAESIRAVVGNNSAGADAE
		** ***** ** * * * * * * * * * * ***** *
At_HPR2,	61	LISDLPNLEIVSSFSVGLDKIDLKCKEKGIRVTNTPDVLTEDVADLAIGLILALLRLIC
Col_HPR2_H	61	LIDALPKLEIVSSFSVGLDKVDLIKCEEKGVRTNTPDVL TDDVADLAIGLILAVLRRIC
		** *
At_HPR2,	121	ECDRYVRSGKWKQGEFQLTTKFSGKSVGIIGLGRIGTAIAKRAEAFSCPINYYSRTIKPD
Col_HPR2_H	121	ECDKYVRRGAWKFGDFKLTTKFSGKRVGLIGLGRIGLAVAERAFAFDCPISYFSRSKKPN
		** *
At_HPR2,	181	VAYKYYPTVVDLAQNSDILVVACPLTEQTRHIVDRQVMDALGAKGVLINIGRGPHVDEQE
Col_HPR2_H	181	TNYTYGSSVVELASNSDILVVACPLTPETTHIINREVIDALGPKGVLINIGRGPHVDEPE
		* *
At_HPR2,	241	LIKALTEGRLGGAALDVFEQEPHVPEELFGLENVLLPHVSGTVETRNAMADLVVGNLE
Col_HPR2_H	241	LVSALVEGRLGGAGLDVFEREPVPEKLFGLENVLLPHVSGTVETRKVMADLVVGNLE
		* *
At_HPR2,	301	AHFSGKSLTPVV
Col_HPR2_H	301	AHFSGKPLLTPVV
		***** *

Abb. 5.4.: Vergleich der Proteinsequenzen der *Arabidopsis thaliana* HPR2 (At_HPR2) und der *Coleus blumei* HPPR (Col_HPR2_H). Die schwarze Markierung zeigt die Substratbindedomäne, die graue Markierung die katalytische Domäne. Das GxGxxG-Motiv und ein Rossmann-Fold, die beide an der Cosubstrat-Bindung beteiligt sind, sind in rot/fett dargestellt.

Zusätzlich unterschieden sich die K_m -Werte von nativem (Häusler et al., 1991; Häusler, 1989) und rekombinantem Protein stark voneinander, so dass nicht sicher ist, ob es sich bei der isolierten cDNA tatsächlich um die HPPR der Rosmarinsäurebiosynthese handelt. Einen weiteren Hinweis liefern Datenbankabgleiche, da die sequenzähnlichen Proteine aus Pflanzen aus unterschiedlichsten Familien stammen (Janiak, 2007). Einige dieser Pflanzen produzieren Rosmarinsäure (z.B. *Salvia miltiorrhiza*), andere hingegen nicht (z.B. *Arabidopsis thaliana*). Hier stellt sich die Frage, ob die HPPR nicht eine andere Funktion als die vermutete hat.

Erschwert wird jedoch die Isolation der HPPR aus *Coleus blumei* dadurch, dass die Pflanze amphidiploid ist und daher mehrere Versionen eines Gens und damit auch Proteins vorhanden sein können. Bei eigenen Versuchen wurde festgestellt, dass bei einem Southern Blot mit einer Teilsequenz der HPPR von Kim et al. (2004) mehrere Gene (2 bis 4) detektiert werden konnten. Falls diese sowohl in der DNA- als auch in der Proteinsequenz sehr ähnlich sind, ist es schwierig, spezifisch durch funktionelle Aufreinigung das gesuchte Protein zu isolieren, da unter Umständen die Proteine ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften zeigen. Es ist daher möglich, dass von Kim et al. (2004) ein Proteingemisch aufgereinigt wurde und zufällig durch die auf Proteinsequenzen basierenden Primer eine der

Sequenzen isoliert werden konnte, die nicht die HPPR ist. Dennoch scheint die HPPR sehr nah mit der HPR verwandt zu sein, darauf deuten die RNAi-Untersuchungen hin.

	rek. At HPR2	rek. Col HPR2_HPPR	Native HPPR
Temperatur-Optimum	53 °C	40 bis 55 °C	35 bis 37 °C
pH-Optimum	7,4	6,5 bis 7,0	6,5 bis 7,0

Tabelle 5.1.: Temperatur- und pH-Optima von HPR-Enzymen im Vergleich. Rek. At HPR2 (rekombinante HPR2 aus *Arabidopsis thaliana*), rek. Col HPR2_HPPR (rekombinante HPR2 bzw. HPPR aus *Coleus blumei*), native HPPR (native HPPR aus *Coleus blumei*-Zellkultur aufgereinigt).

Die Temperatur- und pH-Optima liegen bei allen Enzymen in ähnlichen Bereichen, Ausnahme ist das Temperatur-Optimum der nativen HPPR (Tabelle 5.1.). Die pH-Optima liegen in normalen physiologischen Bereichen (Roberts et al., 1980). Das Temperatur-Optimum der beiden rekombinanten Enzyme ist mit etwa 50 °C verhältnismäßig hoch. Das könnte eventuell mit der Funktion der HPR als Enzym der Photorespiration zusammenhängen. Pflanzen zeigen vor allem eine hohe Photorespirationsrate, wenn der Sauerstoffpartialdruck außerhalb oder auch innerhalb der Pflanze steigt, also die Sauerstoff-Fixierung der RubisCO sehr hoch ist (Foyer et al., 2009). Dies geschieht vor allem, wenn hohe Außentemperaturen und starker Lichteinfall vorherrschen und die Pflanzen photosynthetisch stark aktiv sind. Ferner ist bei hohen Temperaturen oft der Wasserhaushalt der Pflanzen negativ betroffen, und der Gasaustausch ist durch geschlossene Stomata unterbunden. Daher ist es für die Enzyme der Photorespiration sinnvoll, vor allem bei höheren Temperaturen ihre stärkste Aktivität zu entfalten, da hohe Temperaturen die Photorespiration nötig machen. Dies könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass die rekombinante HPPR von Kim et al. (2004) nicht ein spezifisches Enzym für die Rosmarinsäurebiosynthese ist, sondern ein Homolog zum Photorespirationsenzym HPR2 aus *Arabidopsis*.

	rek. At HPR2	rek. At HPR2	rek. Col HPR2_HPPR	native HPPR
K _m NADPH	0,132 mM (HP)	0,008 mM (P)	0,02 mM (P)	0,095 mM (pHPP)
K _m NADH	0,260 mM (HP)	0,400 mM (P)	0,50 mM (P)	0,190 mM (pHPP)

Tabelle 5.2.: K_m-Werte der HPR/HPPR für NADPH und NADH (mit Pyruvat als Substrat) im Vergleich. Rek. At HPR2 (rekombinante HPR2 aus *Arabidopsis thaliana*), rek. Col HPR2_HPPR (rekombinante HPR2 bzw. HPPR aus *Coleus blumei*), native HPPR (native HPPR aus *Coleus blumei*-Zellkultur aufgereinigt), HP (Hydroxypyruvat als Substrat), P (Pyruvat als Substrat), pHPP (4-Hydroxyphenylpyruvat als Substrat).

Die K_m -Werte der rekombinanten *Coleus* HPPR zeigen eine deutliche Präferenz für NADPH, während die *Arabidopsis* HPR und die native HPPR NADPH nur mit doppelt so hoher Affinität akzeptieren wie NADH. Dies deckt sich mit bisherigen Ergebnissen, da die HPR2 ein NADPH-abhängiges Enzym. Es ist jedoch auch in der Lage, NADH für die Reaktion zu verwenden (Kleczkowski und Edwards, 1989). Da aber über die Datenbank BRENDA für kein pflanzliches HPR-Enzym die K_m -Werte für die Cofaktoren zu finden sind, ist es schwer zu beurteilen, ob die HPR1 nun tatsächlich NADH bevorzugt oder nicht. Strukturell lässt sich jedoch sagen, dass die NADH-bevorzugenden Proteine wie die HPR1 einen Asparaginsäurerest, die HPR2 und HPPR hingegen einen Serinrest (Ser174) tragen (Tabelle 5.3.) (Booth et al. 2006). Dieser Asparaginsäurerest verhindert, dass die negativ geladene Phosphatgruppe des NADPH am Enzym binden kann.

	rek. At HPR2	rek. Col HPR2_HPPR	Native HPPR
K_m Hydroxypyruvat	0,71 mM	1,00 mM	-
K_m Pyruvat	10,30 mM	25,00 mM	Hemmung!
K_m Glyoxylat	3,00 mM	2,00 mM	-
K_m pHPP	(1,20 mM)	16,60 mM	0,01 mM
K_m DHPP	-	-	0,13 mM

Tabelle 5.3.: K_m -Werte der HPR/HPPR für verschiedene Substrate. – (nicht gemessen).

Um die Substratspezifitäten der verschiedenen HPRs optimal vergleichen zu können, fehlen leider einige Werte, die entweder aus Substratmangel (DHPP) oder aufgrund mangelnden Wissens nicht gemessen wurden. Es ist jedoch deutlich, dass das rekombinante Enzym aus *Arabidopsis* recht ähnliche Substratspezifitäten aufweist wie das rekombinante *Coleus*-Enzym. Dabei wird definitiv Hydroxypyruvat bevorzugt akzeptiert (K_m 0,71 mM bzw. 1,0 mM). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die spezifische Aktivität für Hydroxypyruvat viel höher ist als für Pyruvat, daher ist Hydroxypyruvat das bevorzugte und damit vermutlich das natürliche Substrat.

Vergleicht man jedoch die K_m -Werte für pHPP, sind deutliche Unterschiede festzustellen. Das rekombinante *Coleus*-Enzym nimmt pHPP nur sehr schlecht als Substrat (K_m 16,6 mM), die native HPPR jedoch sehr gut (K_m 0,01 mM). Diese Werte legen den Verdacht nahe, dass die native HPPR ein anderes Enzym ist als die rekombinante HPPR aus *Coleus*. Durch die K_m -Werte zeigt sie ein ähnliches katalytisches Verhalten wie die HPR2 aus *Arabidopsis*. Sie sind deshalb vermutlich näher miteinander verwandt, eventuell sogar homologe Enzyme. Es zeigt auch, dass die HPR2 aus *Arabidopsis* durchaus in der Lage ist, die Reaktion der HPPR durchzuführen, wenn sie auch eine geringere Affinität zu pHPP aufweist als zu Hydroxypyruvat. Die Affinität gegenüber Pyruvat ist jedoch noch geringer.

Obwohl die HPR2 aus *Arabidopsis* mit Lactat keine Rückreaktion zu Pyruvat zeigt, wird Pyruvat jedoch als Substrat für die Hinreaktion akzeptiert, wenn auch mit viel geringerer Affinität als Hydroxypyruvat oder Glyoxylat. Glycerat hingegen wird zu Hydroxypyruvat umgesetzt. Dies lässt ebenfalls darauf schließen, dass Hydroxypyruvat das natürliche Substrat dieses Enzyms ist.

Die HPPR aus *Coleus* wurde von Janiak (2007) nicht auf die Oxidationsreaktionen getestet. Bei der nativen HPPR ist eine kompetitive Hemmung durch die Zugabe von Lactat zu beobachten. Vermutet wird hier, dass Lactat zwar umgesetzt wird, aber das Produkt Pyruvat das aktive Zentrum des Enzyms nicht verlassen kann und somit jede weitere Reaktion unterbindet. Eine Zugabe von Pyruvat zu einem Reaktionsansatz mit DHPP führte bei Konzentration von 4 mM Pyruvat zu einer kompletten Blockierung der Reduktionsreaktion, die native HPPR wird durch Pyruvat irreversibel gehemmt (Häusler et al., 1991). Dieser Effekt wurde bei den beiden rekombinanten Enzymen nicht untersucht. Außerdem akzeptieren beide Enzyme Pyruvat als Substrat und es ist unwahrscheinlich, dass genau derselbe Effekt zu beobachten ist.

5.7. Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten RNAi- und Überexpressionsversuche wurden mit der Pflanze *Coleus blumei* durchgeführt, da an Zellkulturen dieser Pflanze die Rosmarinsäurebiosynthese aufgeklärt wurde (Petersen et al., 1993). Seitdem konnten die cDNA-Sequenzen der HPPR (Kim et al., 2004) und der RAS (Berger et al., 2006) aus *Coleus blumei* gewonnen und die heterolog exprimierten Enzyme charakterisiert werden. Ziel der RNAi- und Überexpressionsuntersuchungen war es, abzuklären, ob die erhaltenen Sequenzen tatsächlich einen Beitrag zur Rosmarinsäurebiosynthese leisten. Da jedoch nicht bekannt ist, wie viele Kopien der HPPR und der RAS im Genom von *Coleus blumei* tatsächlich existieren und die Pflanze amphidiploid ist, sind die Ergebnisse der RNAi-Studien schwer zu beurteilen. Zumindest für die HPPR-RNAi steht fest, dass mehr als nur ein Gen mit dem ausgewählten RNAi-Bereich herunterreguliert werden könnte, da dieser Sequenzbereich, in Southern Blots als Sonde verwendet, auf bis zu vier Genkopien schließen lässt (Abb. 4.58.). Für die RAS wurde kein Southern Blot durchgeführt, bei dem die verwendete RNAi-Sequenz als Sonde getestet wurde. Es ist jedoch zu vermuten, dass ebenfalls mehrere Gene damit detektiert werden könnten. Zusätzlich lässt auch eine klonierte Teilsequenz auf ein weiteres RAS-Gen schließen (mündliche Mitteilung, Johannes Benner). Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, die RNAi-Experimente an der diploiden Art *Melissa officinalis* zu wiederholen, da hier zumindest für die RAS eine cDNA-Sequenz vorhanden ist und nur eine Kopie des Gens

vorliegt (Weitzel, 2009). Noch interessanter wäre diese Wiederholung jedoch für die HPPR, aber hierzu liegen in *Melissa officinalis* noch keine Daten zu cDNA und Genkopienzahl vor. Würde man die Rosmarinsäurebiosynthese und deren Regulation an *Coleus blumei* weiterverfolgen, wäre es nötig, nach alternativen Sequenzen sowohl von HPPR als auch von RAS zu suchen. Durch Southern Blot und eventuell auch Northern Blot könnte man die Anzahl der Genkopien ermitteln und eventuell auch Sequenzen gewinnen, in dem man gezielt die auf dem Blot erhaltenen Banden durch PCR vervielfältigt und sequenziert (Sheikh und Lazarus, 1997). Eine weitere Möglichkeit wäre es, eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung des Enzymrohextraktes durchzuführen und nicht nur die HPPR-Aktivität zu testen, sondern auch die HPR-Aktivität, um zu sehen, ob sich diese beiden Aktivitäten trennen lassen. So konnten eine NADH-bevorzugende HPR und eine NADPH-bevorzugende HPR aus Mais voneinander getrennt werden (Kleczkowski und Edwards, 1989). Vielleicht gelänge es auf diesem Weg, eine HPPR zu finden, die spezifisch für die Rosmarinsäurebiosynthese ist.

Die Überexpressionsexperimente der Gene HPPR und RAS waren nur teilweise erfolgreich. Nur die HPPR konnte tatsächlich überexprimiert werden, wobei es jedoch nur zu einer geringfügig vermehrten Akkumulation von Rosmarinsäure kam. Die Überexpression der RAS führte zu einer Cosuppression, und es konnte folglich keine Steigerung des Rosmarinsäuregehalts erzielt werden. Hierfür wäre die Verwendung eines induzierbaren Promotors interessant, da dadurch zumindest die Cosuppression der RAS umgangen werden könnte (Que et al., 1997). Es könnten auch mehrere Gene der Rosmarinsäure zusammen als Überexpressionskonstrukte in die Pflanzen eingebracht werden, um zu sehen ob eine Kombination verschiedener überexprimierter Gene zu einer stärkeren Rosmarinsäureakkumulation führt. Möglich wäre es auch, die Kulturen zu elicetieren, da dadurch auch die Eingangsenzyme der Rosmarinsäurebiosynthese TAT und PAL induziert werden und auf diese Weise vermehrt Zwischenprodukte gebildet würden, die von HPPR und RAS umgesetzt werden könnten. So würde man möglicherweise limitierende Faktoren der Rosmarinsäurebiosynthese in begrenztem Ausmaß verringern und höhere Rosmarinsäuregehalte erzielen können. Dies träfe jedoch nur zu, wenn die HPPR- oder RAS-Aktivitäten die limitierenden Faktoren in der Rosmarinsäurebiosynthese sind.

Sinnvoll erscheint es, regulatorische Studien an *Melissa officinalis* weiter zu führen, da sie eine diploide Pflanze ist und keine amphidiploide wie *Coleus blumei*, wodurch entsprechende Untersuchungen einfacher und aussagekräftiger wären.

Die HPR1 und HPR2 (HPPR) aus *Coleus blumei* und *Arabidopsis thaliana* betreffend, wäre es nötig, die rekombinanten Enzyme auf ihre Substratspezifitäten hin ausführlich zu untersuchen und zu testen, wie gut sie die Substrate für die Rosmarinsäurebiosynthese

tatsächlich akzeptieren und welche Unterschiede bestehen. Die HPR2 aus *Arabidopsis thaliana* besitzt eine sehr ähnliche DNA-Sequenz wie die HPPR aus *Coleus blumei* und kann pHPP umsetzen, doch ist *Arabidopsis thaliana* keine Pflanze die Rosmarinsäure akkumuliert. Es fehlen in *Arabidopsis* jedoch nur wenige Enzyme (RAS, 3'-H und 3-H), um Rosmarinsäure zu bilden. Es wurden bereits Versuche gestartet, die RAS aus *Coleus blumei* in *Arabidopsis* einzubringen und die Transformanten auf den Rosmarinsäuregehalt bzw. auf die Vorstufen der Rosmarinsäure hin zu untersuchen (mündliche Mitteilung Maike Petersen). Damit könnte man auch klären ob, abgesehen von der RAS, hauptsächlich Enzyme der Ligninbiosynthese (PAL, CAH, 4CL, eventuell 3- und 3'-Hydroxylasen), der Tocopherol- bzw. Plastochinonbiosynthese (TAT) und der Photorespiration (HPR) an der Rosmarinsäurebiosynthese beteiligt sind. Dies sind sehr grundlegende Stoffwechselwege, die in allen Pflanzen vorliegen. Somit wäre eventuell nur die RAS ein spezifisches Enzym, welches sich möglicherweise aus einer HCT des Phenylpropanstoffwechsels entwickelt hat (Petersen et al., 2009).

6. Zusammenfassung

Die Rosmarinsäurebiosynthese ist an Zellkulturen von *Coleus blumei* (Lamiaceae) aufgeklärt worden. Die beteiligten Enzyme sind bekannt und wurden charakterisiert und die meisten entsprechenden Gene kloniert. Unter diesen Enzymen befinden sich die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) und die Rosmarinsäure Synthase (RAS), von denen vermutet wird, dass sie spezifisch für Rosmarinsäurebiosynthese sind. Um dies abzuklären und eventuell regulatorische Mechanismen festzustellen, sollten diese beiden Enzyme durch die Technik der RNAi herunterreguliert und der Effekt auf die Rosmarinsäureakkumulation beobachtet werden. Zusätzlich sollte durch die jeweilige Überexpression der Gene geklärt werden, ob sich der Rosmarinsäuregehalt dadurch steigern lässt.

Zur Klonierung der RNAi- bzw. Überexpressionskonstrukte wurde der pHANNIBAL-Vektor in Kombination mit dem binären Vektor pART27 verwendet.

Die RNAi- und die Überexpressions-Konstrukte in pART27 wurden durch die Transformation von sterilem Pflanzenmaterial mit *Agrobacterium rhizogenes* stabil in das Genom von *Coleus blumei* eingebracht. Die Untersuchungen wurden an den durch die Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* erhaltenen Hairy Roots in Flüssigkultur durchgeführt. Da verschiedene sterile Pflanzenkulturen und verschiedene *Agrobacterium rhizogenes*-Stämme zur Verfügung standen, wurde zuerst eine Testtransformation mit verschiedenen *Coleus blumei*/*Agrobacterium rhizogenes*-Kombinationen durchgeführt. Dazu wurden Kontroll-Transformationen mit Agrobakterien ohne zusätzliche Plasmid-DNA gemacht und Transformationen mit HPPR-RNAi-Konstrukt transformierten Agrobakterien. Als beste Kombination stellte sich die Pflanzenlinie ColV1 mit dem *Agrobacterium rhizogenes*-Stamm LBA15834 heraus. Sie lieferte die vitalsten Wurzeln und zeigte einen akzeptablen Rosmarinsäuregehalt von etwa 1,5 % im Trockengewicht der Hairy Roots. Zusätzlich zeigten die daraus gewonnen Hairy Root-Kulturen den deutlichsten RNAi-Effekt. Diese Pflanzen/Agrobakterien-Kombination wurde für die Transformation der Pflanzen mit den HPPR- und RAS-RNAi- und Überexpressionskonstrukten und den entsprechenden Kontrollplasmiden verwendet. Für die Kontrollen wurde Pflanzenmaterial mit Agrobakterien mit Expressionsvektor ohne Fremd-DNA oder ohne Vektor transformiert.

Die gewonnenen Hairy Root-Flüssigkulturen wurden molekularbiologisch untersucht und auf die Anwesenheit der Konstrukte, die Abwesenheit von Agrobakterien, die Anwesenheit der Agrobakterien-Gene *rolA*, *rolB* und *rolC* und die mRNA-Gehalte von RAS und HPPR getestet. Zur Bestimmung der Anzahl der Transformationsereignisse wurden Southern Blots durchgeführt. Dazu wurden einmal 35S Promotor des pHANNIBAL und einmal das *nptII*-Gen des pART27 mit einer entsprechenden Sonde nachgewiesen. Es lagen jeweils mehrere Transformationsereignisse vor.

Anschließend fand eine kurze Kulturcharakterisierung statt, um einen optimalen Erntezeitpunkt für die zu messenden Enzyme und die Rosmarinsäuregehalte zu ermitteln.

Dabei stellte sich der zwölfte Kulturtag als günstig heraus. Folglich wurde für die Untersuchungen an den Hairy Root-Linien am zwölften Kulturtag Pflanzenmaterial geerntet. Für diese Untersuchungen wurde der Rosmarinsäuregehalt bestimmt und die Aktivitäten der Enzyme Tyrosin Aminotransferase (TAT), Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL), HPPR und RAS bestimmt. Die Auswirkungen der RNAi und Überexpression machten sich vor allem in den Rosmarinsäuregehalten bemerkbar. Die RNAi-Linien zeigten einen deutlich verringerten Gehalt, die HPPR-Überexpressionslinien einen erhöhten Gehalt. Die Enzymaktivitäten aus Proteinrohextrakte zeigten bei den RNAi-Linien keine Reduktion, bei den Überexpressionslinien hingegen konnte bei HPPR eine deutlich höhere Aktivität gemessen werden. Die RAS-Überexpressionslinien zeigten Cosuppression und verhielten sich ähnlich wie die RAS-RNAi-Linien oder die Kontrollen.

Die Hairy Root-Linien wurden auf eine Akkumulation von Zwischenprodukten der Rosmarinsäurebiosynthese hin untersucht, es konnte jedoch nur Kaffeesäure nachgewiesen werden, die jedoch in keinem Bezug zur verminderten oder erhöhten Rosmarinsäureakkumulation stand.

L-Tyrosin und L-Phenylalanin sind die Ausgangsverbindungen der Rosmarinsäurebiosynthese. Bei Supplementationsversuchen wurde dem Kulturmedien von Kontroll-Linien ohne Vektor und Überexpressionslinien von HPPR und RAS die Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin zugesetzt. Die supplementierten Kulturen zeigten jedoch gegenüber den unsupplementierten Kontrollen keine vermehrte Rosmarinsäureakkumulation. Die Ausgangsverbindungen sind also kein limitierender Faktor für die Rosmarinsäureakkumulation dieser Kulturen. Der Rosmarinsäurebiosyntheseweg scheint auch nicht durch vermehrtes Vorhandensein der Aminosäuren induziert zu werden.

Da die HPPR aus *Coleus blumei* sehr nah mit der Hydroxypyruvat Reduktase (HPR2) aus *Arabidopsis thaliana* verwandt ist, wurde das bereits in einem Expressionsvektor vorliegende Enzym in *Escherichia. coli* exprimiert und charakterisiert. Die gewonnenen Daten wurden mit den vorhandenen Daten der heterolog exprimierten HPPR und der nativen HPPR aus *Coleus blumei* verglichen. Die Unterschiede zeigten sich vor allem in den K_m -Werten des Rosmarinsäurebiosynthese-Substrats (4-Hydroxyphenylpyruvat) pHPP: hier zeigten die native HPPR und die HPR2 aus *Arabidopsis* eine höhere Affinität als die rekombinante HPPR aus *Coleus*.

Für die HPPR aus *Coleus blumei* konnte aus genomischer DNA eine Sequenz durch Vollängen-Primer amplifiziert werden. Durch Sequenzierung konnte die Lage und Sequenz eines Introns ermittelt werden. Die Zahl der Genkopien der HPPR in *Coleus blumei* konnte durch Southern Blot nicht genau bestimmt werden; es sind jedoch mehrere Kopien vorhanden.

7. Summary

Rosmarinic acid biosynthesis has been elucidated in cell cultures of *Coleus blumei* (Lamiaceae). The involved enzymes are known and have been characterised and some of the corresponding genes have been cloned. Among the enzymes that have been heterologously expressed are hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) and rosmarinic acid synthase (RAS), which might be specific for rosmarinic acid biosynthesis. For the evaluation of those enzymes' function and their possible regulatory mechanisms RNAi down-regulation experiments have been performed. The RNAi effect on the rosmarinic acid content has been measured. The effect of overexpression of both genes on rosmarinic acid accumulation was also evaluated.

The pHANNIBAL vector in combination with the binary vector pART27 was used for the cloning of the RNAi and overexpression constructs.

The RNAi and overexpression constructs were integrated into the genome of *Coleus blumei* with help of *Agrobacterium rhizogenes* resulting in hairy root liquid cultures. Since there were different *Agrobacterium rhizogenes* strains and different *Coleus blumei* sterile plant cultures available, first test transformations were performed to find the best *Coleus blumei*/*Agrobacterium rhizogenes* combination. For the test transformations agrobacteria without additional vector DNA and agrobacteria transformed with the HPPR RNAi construct were used. The best combination was the plant line ColV1 with the *Agrobacterium rhizogenes* strain LBA15834. They generated the most viable hairy roots and showed an acceptable rosmarinic acid content of 1.5 % in the dry weight. Additionally those hairy roots demonstrated the most obvious RNAi effects. This plant/agrobacterium combination has been used for further transformation of *Coleus blumei* with RNAi and overexpression constructs of HPPR and RAS and the controls. As controls there was plant material transformed with the acrobacteria carrying the empty binary vector pART27 and untransformed agrobacteria.

The obtained hairy root liquid cultures were analysed by molecular biological methods for the absence of agrobacteria, the presence of the inserted construct, the presence of the agrobacterial genes *rolA*, *rolB*, *rolC* and the transcript levels of HPPR and RAS. Southern blots were executed to determine the number of T-DNA insertions of the constructs. The 35S promoter of the pHANNIBAL vector and the *nptII* gene of the pART27 vector were used as probes. Several transformation events were observed in all the hairy root lines.

The hairy root cultures were characterised to determine the best harvest time for the measurements of enzyme activities and rosmarinic acid content. Day twelve of the cultivation period was the best option. The hairy roots were analysed with respect to their rosmarinic acid content, the enzyme activities of tyrosine aminotransferase (TAT), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), HPPR and RAS. The RNAi and overexpression effects were most

pronounced in the rosmarinic acid contents. The RNAi lines showed a reduced and the HPPR overexpression lines an elevated content. The enzyme activities in protein extracts of the RNAi lines showed no reduction. The HPPR overexpression lines had an increased HPPR activity. RAS overexpression lines exhibited co-suppression and showed similar results as the controls or RAS RNAi lines.

The hairy root lines have been analysed for the accumulation of intermediates of rosmarinic acid biosynthesis. Only caffeic acid could be detected but showed no correlation to the reduced or elevated rosmarinic acid content.

L-Tyrosine and L-phenylalanine are the precursors for rosmarinic acid biosynthesis. Control lines and overexpression lines of HPPR and RAS were supplemented with these two amino acids. There was no change in the rosmarinic acid content compared to non-supplemented controls. The amino acids are not limiting for rosmarinic acid accumulation and the biosynthesis is not induced by the oversupply of these aromatic amino acids.

HPPR of *Coleus blumei* is closely related to the cytosolic hydroxypyruvate reductase (HPR2) of *Arabidopsis thaliana* and was available as heterologously enzyme. The enzyme was characterised and the obtained data was compared with the data of the heterologously expressed HPPR and the native HPPR of *Coleus blumei*. The most obvious difference was the K_m value for the rosmarinic acid biosynthesis substrate 4-hydroxyphenylpyruvate. The native HPPR of *Coleus blumei* and the HPR2 of *Arabidopsis thaliana* displayed a higher affinity for this substrate than the heterologously expressed HPPR of *Coleus blumei*.

A genomic sequence of HPPR from *Coleus blumei* could be amplified with full-length primers. The sequence and position of an intron could be identified. The number of genomic copies of the HPPR could not be determined exactly by Southern blotting but more than one copy were observed.

8. Literaturverzeichnis

Abdullah Y., Schneider B. Petersen M. (2008) Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in *Marantaceae* species. *Phytochemistry Letters*, 1:199-203

Al-Qsous S., Carpentier E., Klein-Eude D., Burel C., Mareck A., Dauchel H. Gomord V., Balangé A.P. (2004) Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta*, 219:369-378

Antognoni F., Faudale F., Poli F., Biondi S. (2009) Methyl jasmonate differentially affects tocopherol content and tyrosine amino transferase activity in cultured cells of *Amaranthus caudatus* and *Chenopodium quinoa*. *Plant Biology*, 11:161-169

Berger, A. Meinhard J., Petersen M. (2006) Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta*, 224:1503-1510

Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, 35(3):215-217

Bertani G. (1951) Study on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3):293-300

Birnboim H.C. und **Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7 (6) 1513-1523

Blount J.W., Korth K.L., Masoud S.A., Rasmussen S., Lamb C., Dixon R.A. (2000) Altering Expression of Cinnamic Acid 4-Hydroxylase in Transgenic Plants Provides Evidence for a Feedback Loop at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*, 122:107-116

Bonnhomme V., Laurin-Mattar D., Fliniaux M.A. (1999) Effects of the *roIC* gene on Hairy Root : Induction Development und Tropane Alkaloid Production by *Atropa belladonna*.

Booth M.P.S., Connors R., Rumsby G., Brady R.L. (2006) Structural Basis of Substrate Specificity in Human Glyoxylate Reductase/Hydroxypyruvate Reductase. *Journal of Molecular Biology*, 360:178-189

Bradford M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254

Bulgakov V., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Shkryl Y.N., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2004) The *roIB* and *roIC* genes activate synthesis of anthraquinones in *Rubia cordifolia* cells by mechanism independent of octadecanoid signalling pathway. *Plant Science*, 166:1069-1075

Bulgakov V., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Kiselev K.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu (2005) Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes roIC* gene on rhabdosin and rosmarinic acid production in *Erythrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta*, 221:471-478

Castle L.A., Errampalli D., Atherton T.L., Franzmann L.H., Yoon E.S., Meinke D.W. (1993) Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*, 241:504-514

Cerutti H. und **Casas-Mollano J.A.** (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics*, 50:81-99

Chilton M., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977) Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell*, 11:263-271

- Chinn A.M. und Comai L. (1996)** Gene Transcription. Transgenic Plants: A production system for industrial and pharmaceutical proteins (ed. Owen M.R.L. und Pen J.), 27-48
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162:156-159
- Coleman H.D., Park J.Y., Nair R., Chapple C., Mansfield S.D. (2008)** RNAi-mediated suppression of p-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(11):4501-4506
- Cook D.M. und Farrand S.K. (1992)** The oriT of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. Journal of Bacteriology, 4(19):6238-6246
- D'Auria J.C. (2006)** Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Current Opinion in Plant Biology, 9:331-340
- De Greve H., Dhaese P., Seurinck J., Lemmers M., Van Montagu M., Schell J. (1982)** Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. Journal of molecular and applied genetics, 1(6):499-511
- De Tommasi N., De Simone F., De Feo V., Pizza C. (1991)** Phenylpropanoid Glycosides and Rosmarinic Acid from *Momordica balsamina*. Planta Medica, 57:201
- Ding S., Lu Q., Zhang Y., Yang Z., Wen X., Zhang L., Lu C. (2009)** Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. Plant Molecular Biology, 69(5):577-592
- Dixon D.P. und Edwards R. (2006)** Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 171:360-366
- Doenecke D., Koolman J., Fuchs G., Gerok W. (2005)** Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, Thieme-Verlag, 15. Auflage
- Ellis B.E. und Towers H.G. (1970)** Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. The Biochemical Journal, 118(2):291-297
- Engler-Blum G., Meier M., Frank J., Müller G. A. (1993)** Reduction of Background Problems in Nonradioactive Northern and Southern Blot Analyses Enables Higher Sensitivity Than ³²P-Based Hybridizations. Analytical Biochemistry, 210:235-244
- Farrand S.K., van Berkum P.B., Oger Philippe (2003)** *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53:1681-1687
- Filipenko E.A., Filipenko M.L., Deineko E.V., Shumnyi V.K. (2007)** Analysis of integration sites of T-DNA insertions in transgenic tobacco plants. Cytology and Genetics, 41(4):199-203
- Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C. (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391(6669):806-11
- Foyer C.H., Bloom A., Queval G., Noctor G. (2009)** Photorespiratory Metabolism : Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. Annual Review of Plant Biology, 60:455-485
- Fujiwara H., Tanaka Y., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi-Mizutani M., Nakao M., Fukui Y., Yamaguchi M., Ashikari T., Kusumi T. (1998)** cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. Plant Journal, 16:421-431
- Geisler C. (2001)** Die Insertion von rol-Genen in zellzyklussynchronisierten Karottenzellkulturen (Dissertation)

- Gertlowski C., Petersen M. (1993)** Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 34:183-190
- Ghildiyal M., Seitz H., Horwich M.D., Li C., Du T., Lee S., Xu J., Kittler E.L.W., Zapp M.L., Weng Z., Zamore P.C. (2008)** Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. Science, 320(5879):1077-1081
- Giri A., Ravindra S.T., Dhingra V., Narasu M.L. (2001)** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. Current Science, 81(4):378-382
- Gleave A.P. (1992)** A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology, 20(6):1203-1207
- Grant G.A. (1989)** A new family of 2-hydroxyacid dehydrogenases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 165(3):1371-1374
- Griffith F. (1928)** The significance of pneumococcal types. Journal of Hygeny, 27:113-159
- Hagiya M., Close T.J., Tait R.C., Kado C.I. (1985)** Identification of pTiC58 plasmid-encoded proteins for virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82(9):2669-2673
- Harborne J.B. (1966)** Caffeic acid ester distribution in higher plants. Zeitschrift für Naturforschung, 21b:604-605
- Harpster H.M., Townsend J.A., Jones J.D., Bedbrook J., Dunsmuir P. (1988)** Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, 1',2', and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. Molecular and general Genetics, 212(1):182-190
- Hasanloo T., Sepehrifar R., Rahnama H., Shams M.R. (2009)** Evaluation of the yeast-extract signalling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root cultures. World of Micorobiological Biotechnology, 25:1901-1909
- Häusler E. (1989)** Charakterisierung der Hydroxyphenylpyruvatreduktase aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei*. Diplomarbeit
- Häusler E., Petersen M., Alfermann A.W. (1991)** Hydroxyphenylpyruvat Reductase from Cell Suspension Cultures of *Coleus blumei* Benth. Zeitschrift für Naturforschung, 46c:371-376
- Helliwell C. und Waterhouse P. (2003).** Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. Methods, 30:289-295
- Herridge D. (ed.) Singleton P., Keyser H. und Sande E. (2002).** Development and Evaluation of Liquid Inoculants. Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam, 52-66
- Heupel R., Markgraf T., Robinson D.G., Heldt H.W. (1991)** Compartmentation studies on spinach leaf peroxisomes: Evidence for channelling of photorespiratory metabolites in peroxisomes devoid of intact boundary membrane. Plant Physiology, 96:971-979
- Hoffmann L., Maury S., Martz F., Geoffroy P., Legrand M. (2003)** Purification, cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. Journal of Biological Chemistry, 278:95-103
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. (2004)** Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzym A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. The Plant Cell, 16:1446-1456
- Holländer-Czytko H., Grabowski J., Sandorf I., Weckermann K., Weiler E.W. (2005)** Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. Journal of Plant Physiology, 162:767-770

- Holtorf S.**, Apel K., Bohlmann H. (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 29:637-646
- Janiak**, Verena (2007) Charakterisierung und Struktur einer Hydroxy(phenyl)pyruvat Reduktase aus *Coleus blumei*, Dissertation
- Janning W.** und **Knust E.** (2004) Genetik: Allgemeine Genetik – Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik. Georg Thieme Verlag
- Jones D.H.** (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in a plant development. Phytochemistry, 23(7):1349-1359
- Jones-Rhoades M.W.**, Bartel D.P., Bartel B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annual Review of Plant Biology. 57:19-53
- Kaplan F.** und **Guy C.L.** (2005) RNA interference of Arabidopsis beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. Plant Journal, 44(5):730-743
- Karavangeli M.**, Labrou N.E., Clonis Y.D., Tsaftaris A. (2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-Transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. Biomolecular Engineering, 22:121-128
- Kay R.**, Chan A., Daly M., McPherson J. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. Science, 236:1299-1302
- Kelley C.J.**, Mahajan J.R., Brooks L.C., Neubert L.A., Breneman W.R., Carmack M. (1975) Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. Journal of Organic Chemistry, 40(12):1804-1815
- Kempe K.**, Higashi Y., Frick S. Sabarna K., Kutchan T.M. (2009) RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene salAT and evidence of association of pathway enzymes. Phytochemistry, 70:579-589
- Kim**, K.H. Janiak V., Petersen M. (2004) Purification, cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. Plant Molecular Biology, 54:311-323
- Kleczkowski L.A.** und **Randall D.D.** (1988) Purification and characterization of a novel NADPH(NADH)-dependent hydroxypyruvate reductase from spinach leaves. Comparison of immunological properties of leaf hydroxypyruvate reductases. Biochemical Journal, 250:145-152
- Kleczkowski L.A.** **Edwards G.E.** (1989) Identification of Hydroxypyruvate und Glyoxylate Reductase in Maize Leaves. Plant Physiology, 91:278-286
- Kochhar S.**, Hunziker P.E., Leong-Morgenthaler P., Hottinger H. (1992) Primary Structure, Physiochemical Properties, and Chemical Modification of NAD⁺-dependant D-Lactate Dehydrogenase. The Journal of Biological Chemistry, 267:8499-8513
- Lage H.** (2009) Therapeutic potential of RNA interference in drug-resistant cancers. Future Oncology, 5(2):169-185
- Lee R.**, Feinbaum R., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75(5):843–854
- Lee Y.**, Nakahara K., Pham J., Kim K., He Z., Sontheimer E., Carthew R. (2004) Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. Cell, 117(1):69–81
- Lindner E.**, Dohadwalla A.N., Bhattacharya B.K. (1979) Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskohli*: Forskolin. Arzneimittelforschung, 28(2):284-289

- Lu R.**, Maduro M., Li F., Li H., Broitman-Maduro G., Li W., Ding S. (2005) Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436(7053):1040–1043
- Ma X.**, Koepke J., Panjikar S., Fritzsche G., Stöckigt J. (2005) Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *The Journal of Biological Biochemistry*, 280:13576-13583
- MacDonald M.J.** und **D’Cunha G.B.** (2007) A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 85:273-282
- Mansoor S.**, Amin I., Hussain M., Zafar Y., Briddon R.W. (2006) Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends in Plant Science*, 11:559-565
- Mano S.**, Hayashi M., Kondo M., Nishimura M. (1997) Hydroxypyruvate Reductase with a Carboxy-Terminal Targeting Signal to Microbodies is Expressed in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 38(4):449-455
- Mano S.**, Hayashi M. und Nishimura M. (1999) Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *The Plant Journal*, 17(3):309-320
- Martineau B.**, Voelker T.A., Sanders R.A. (1994) On defining T-DNA. *The Plant Cell*, 6:1032-1032
- McGinnis K.**, Murphy N., Carlson A.R., Akula A., Akula C., Basinger H., Carlson M., Hermanson P., Kovacevic N., McGill M.A., Seshadri V., Yoyokie J., Cone K., Kaeppler H.F., Kaeppler S.M., Springer N.M. (2007) Assessing the Efficiency of RNA Interference For Maize Functional Genomics. *Plant Physiology*, 143:1441-1451
- McCarty M.** und **Avery O.T.** (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, 79:137-158
- Moore L.W.**, Chilton W.S., Canfield M.L. (1997) Diversity of Opines and Opine-Catabolizing Bacteria Isolated from Naturally Occurring Crown Gall Tumors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1):201-207
- Moriguchi K.**, Maeda Y., Satou M., Kataoka M., Tanaka N., Yoshida K. (2000) Analysis of Unique Variable Region of a Plant Root Inducing Plasmid, pRi1724, by the Construction of its Physical Map and Library. *DNA Research*, 7:157-163
- Moyano E.**, Jouhikainen K., Tammela P., Palazón J., Cusidó R.M., Pinol M.T., Teeri T.H., Oksman-Caldentey K.-M. (2003) Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany*, 54(381):203-211
- Murray M.G.** und **Thompson W.F.** (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 3:4321-4325
- Napoli C.**, Lemieux C., Jorgensen R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene *in trans*. *The Plant Cell*, 2:279-289
- Nguyen T.**, Mencoal E.M., Harborth J., Fruehauf J.H. (2008) RNAi therapeutics: an update on delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 10(2):158-167
- Odell J.T.**, Nagy F., Chua N. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313:810-812
- Olivier D.K.**, Van Wyk B.E., van Heerden F.R. (2008) The chemotaxonomic and medicinal significance of phenolic acids in *Arctopus* and *Alepidea* (Apiaceae subfamily Saniculoideae). *Biochemical Systematic Ecology*, 36:724-729
- Palauqui J.-C.**, Elmayan T., de Borne F.D., Crété P., Charles C., Vaucheret H. (1996) Frequencies, timing, and spatial patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 112:1447-1456

- Pan Q.**, Tilanus H.W., Janssen H.L., van der Laan L.J. (2009) Prospects of RNAi and microRNA-based therapies for hepatitis C. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(6):713-724
- Petersen M.S.** (1991) Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry*, 30(9):2877-2881
- Petersen M.**, Häusler E., Karwatzki B., Meinhard J. (1993) Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Bent. *Planta*, 189:10-14
- Petersen M.**, Häusler E., Meinhard J., Karwatzki B., Gertlowski C. (1994) The biosynthesis of rosmarinic acid suspension cultures *Coleus blumei*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38:171-179
- Petersen M.** (1997) Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry*, 45:1165-1172
- Petersen M.** und **Simmonds M.S.J.** (2003) Molecules of Interest: Rosmarinic Acid. *Phytochemistry*, 62:121-125
- Petersen M.**, Abdullah Y., Benner J., Eberle D., Gehlen K., Hücherig S., Janiak V., Kim K.H., Sander M., Weitzel C., Wolters S. (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15-16):1663-1679
- Piper K.R.**, Beck von Bodman S., Farrand S.K. (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature*, 362(6419):448-450
- Praveen S.**, Ramesh S.V., Mishra A.K., Koundal V., Palukaitis P. (2009) Silencing potential of viral derived RNAi constructs in Tomato leaf curl virus-AC4 gene suppression in tomato. *Transgenic Research*, epub
- Que Q.**, Wang H.Y., English J.J., Jorgensen R.A. (1997) The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *The Plant Cell*, 9:1357-1368
- Ragasa C.Y.**, Templora V.F., Rideout J.A. (2001) Diastereomeric Diterpenes from *Coleus blumei*. *Chemical Pharmacie Bulletin*, 49(7):927-927
- Ramanathan V.** und **Veluthambi K.** (1995) Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T'-DNA. *Plant Molecular Biology*, 28:1149-1154
- Raven P.H.**, Evert R.F., Eichhorn S.E. (2000) *Biologie der Pflanzen*, 3. Auflage, Walter de Gruyter
- Razzaque A.** und **Ellis B.E.** (1977) Rosmarinic Acid Production in *Coleus* Cell Cultures. *Planta*, 137:287-291
- Reynaerts A.** und **De Sonville A.** (2002) Method for *Agrobacterium* mediated transformation of cotton. United States Patent, No 6483013
- Riker A. J.** (1930) Studies on infectious Hairy Roots of nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research*, 41:507-540
- Roberts J.K.M.**, Ray P.M., Wade-Jardetzky N., Jardetzky O. (1980) Estimation of cytosolic and vacuolar pH in higher plant cells by ³¹P NMR. *Nature*, 283:870-872
- Rogers S. O.** und **Bendich A. J.** (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 5:69-76
- Rogozin I.B.**, Sverdlov A.V., Babenko V.N., Koonin E.V. (2005) Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. *Briefings in Bioinformatics* 6(2):118-134

- Romano N. und Macino G. (1992)** Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6(22):3343–3353
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich A., Arnheim N. (1985)** Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis For Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230:1350-1354
- Saleh, N.M. und Thuc L.V. (2009)** Assessment of hairy roots induction in *Solenostemon scutellarioides* leaves by different strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *African Journal of Biotechnology*, 8(15):3519-3532
- Sandorf I. und Holländer-Czytoko H. (2002)** Jasmonate is involved in the induction of tyrosin aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216:173-179
- Sawada H., Ieki H., Matsuda I. (1995)** PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:828-831
- Scarpati M.L. und Oriente G. (1958)** Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off.*). *Ricerca Scientifica*, 28:2329-2333
- Schmülling T., Schell J. und Spena A. (1988)** Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *The EMBO Journal*, 7(9):2621-2629
- Sheikh S.N. und Lazarus P. (1997)** Re-usable DNA template for the polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Research*, 25(17):3537-3542
- Siebert M., Sommer S., Li S.-H., Wang Z.-X., Severin K., Heide L. (1996)** Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism. *Plant Physiology*, 112:811-819
- Simoh S., Quintana N., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2009)** Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens*-infected *Brassica rapa*. *Journal of Plant Physiology*, 166:1005-1014
- Singh S.K. und Gaur R.K. (2009)** Progress towards therapeutic application of RNA interference for HIV infection. *BioDrugs*, 23(5):269-276
- Singleton P., Keyser H., Sande E. (2002)** Development and evaluation of liquid inoculants. Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. *ACIAR Proceedings* 109e
- Sitte P., Weiler E.W., Kadereit J.W., Bresinsky A., Körner C. (2002)** Strasburger Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage; Spektrum, Akademischer Verlag
- Slightom J.L., Jouanin L., Leach F., Drong R.F., Tepfer D. (1985)** Isolation and identification of TL-DNA/plant junctions in *Convolvulus arvensis* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *The EMBO Journal*, 4(12):3069-3077
- Smith E.F. und Townsend C.O. (1917)** Apple Crown Gall, Caused by *Bacterium tumefaciens*. *Manual of Fruit Diseases*, The Macmillan Company, Hsg.: Hesler L.R.
- Southern E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503-517
- Stöckigt J. und Zenk M.H. (1975)** Chemical Synthesis and Properties of Hydroxycinnamoyl-CoA Derivates. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 306:352-358
- Sunkar R. und Zhu J.-K. (2004)** Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16:2001-2019
- Szabo E. (1993)** Versuche zur Rosmarinsäuresynthese mit Zellkulturen und Pflanzen mit Zellkulturen. Diplomarbeit

- Takeda R.**, Hasegawa J., Sinozaki K. (1990) The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, Anthocerotae (hornworts). *Tetrahedron Letters*, 31:4159-4162
- Timm S.**, Nunes-Nesi A., Pärnik T., Morgenthal K., Wienkoop S., Keerberg O., Weckwerth W., Kleczowski L.A., Fernie A.R., Bauwe H. (2008) A Cytosolic Pathway for the Conversion of Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20:2848-2859
- Thomashow M.F.**, Nutter R., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1980) Integration and Organization of Ti Plasmid Sequences in Crown Gall Tumors. *Cell*, 19:729-739
- Tzfira T.** und **Citovsky V.** (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*
- Van Blokland R.**, Van der Geest N., Mol J.N.M., Kooter J.M. (1994) Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal*, 6:861-77
- Van De Velde W.**, Karimi M., Den Herder G., Van Montagu M., Holsters L., Goormachtig S. (2003) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of plants. *Molecular Methods of Plant Analysis Vol 23: Genetic Transformation of Plants*, Springer-Verlag
- Veena V.** und **Taylor C. G.** (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43:383-403
- Veena V.**, Collier R., Taylor C.G. (2007) Disarmed *Agrobacterium rhizogenes*: A new tool with improved plant transformation characteristics. *Posterbeitrag*
- Verdel A.**, Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S.I.S., Moazed D. (2004) RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex. *Science*, 303:672-676
- Verdonk J.C.**, Haring M.A., van Tunen A.J., Schuurink R.C. (2005) ODORNT1 Regulates Fragrance Biosynthesis in *Petunia* Flowers. *The Plant Cell*, 17:1612-1624
- Visser E.J.W.**, Cohen J.D., Barendse G.W.M., Blom C.W.P.M., Voesenek L.A.C.J. (1996) An Ethylene-Mediated Increase in Sensitivity to Auxin Induces Adventitious Root Formation in Flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology*, 112(4):1687-1692
- Vogelsang K.**, Schneider B., Petersen M. (2006) Production of rosmarinic acid and new rosmarinic acid 3'-O- β -D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. *Planta*, 223:369-373
- Voinnet O.** und **Baulcombe D.C.** (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389(6651):553
- Wang P.**, Liang Z., Zeng J., Li W., Sun X., Miao Z., Tang K. (2008) Generation of tobacco lines with widely different reduction in nicotine levels via RNA approaches. *Journal of Bioscience*, 33(2):177-184
- Wang Y.**, Beaith M., Chalifoux M., Ying J., Uchacz T., Sarvas C., Griffiths R., Kuzma M., Wan J., Huang Y. (2009) Shoot-Specific Down-Regulation of Protein Farnesyltransferase (α -Subunit) for Yield Protection against Drought in Canola. *Molecular Plant*, 2(1):191-200
- Waterhouse P.M.**, Graham M.W., Wang M.-B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Plant Biology*, 95:13959-13964
- Weitzel C.** (2009) Rosmarinsäure-Biosynthese in Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* L. *Dissertation*
- Wesley S. V.**, Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G. und Waterhouse P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27(6):581-590

Winans S.C. (1992) Two-Way Chemical Signalling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. Microbiological Reviews, 56(1):12-31S

Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, **51**, 89-103.

9. Anhang

9.1. Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
3'-H	Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3'-Hydroxylase
3-H	Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3-Hydroxylase
4CL	Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase
A	Ampere
Abb.	Abbildung
bp	base pair/ Basenpaare
BSA	bovine serum albumin/Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CaffCoA	Caffeoyl-CoA
Caff-pHPL	Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllaktat
cDNA	copy DNA, komplementäre DNA
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CoA	Coenzym A
d	Schichtdicke der Küvette
DHPL	3,4-Dihydroxyphenyllaktat
DHPP	3,4-Dihydroxyphenylpyruvat
DNA	deoxyribonucleic acid/Desoxyribunukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
HCS/QT	Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat/Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase
HCT	Hydroxycinnamoyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPPR	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase
HPR	Hydroxypyruvat Reduktase
HST	Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
l	Liter
m	Meter
M	mol/l
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid, red.
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat, red.
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	Pro analysi/für die Analyse
PAL	Phenylalanin Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
pHPL	4-Hydroxyphenyllaktat
PLP	Pyridoxalphosphat
RAS	Rosmarinsäure Synthase

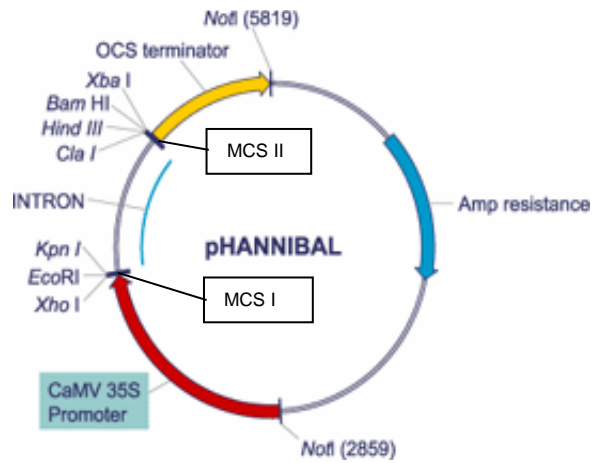
RNA	ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
S	Sievert
s	Sekunden
SDS	Sodium dodecyl sulphate/Natriumlaurylsulfat
t	Messzeit
TAT	Tyrosin Aminotransferase
U	Unit/Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosid

9.2. Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleotide

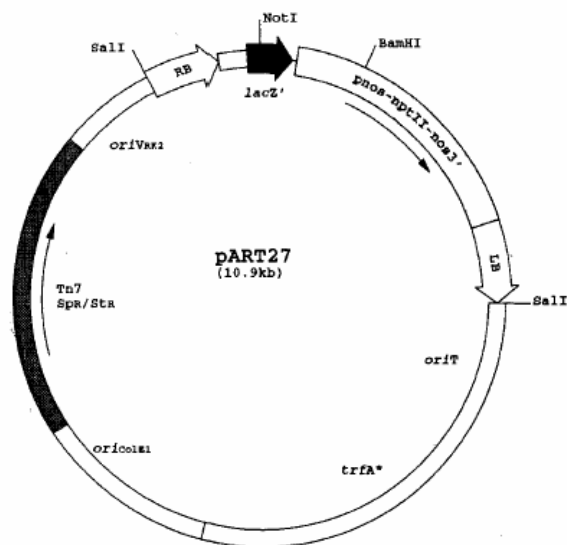
Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Nukleotid	Einbuchstabencode
Adenin	A/a
Guanin	G/g
Cytosin	C/c
Thymin	T/t

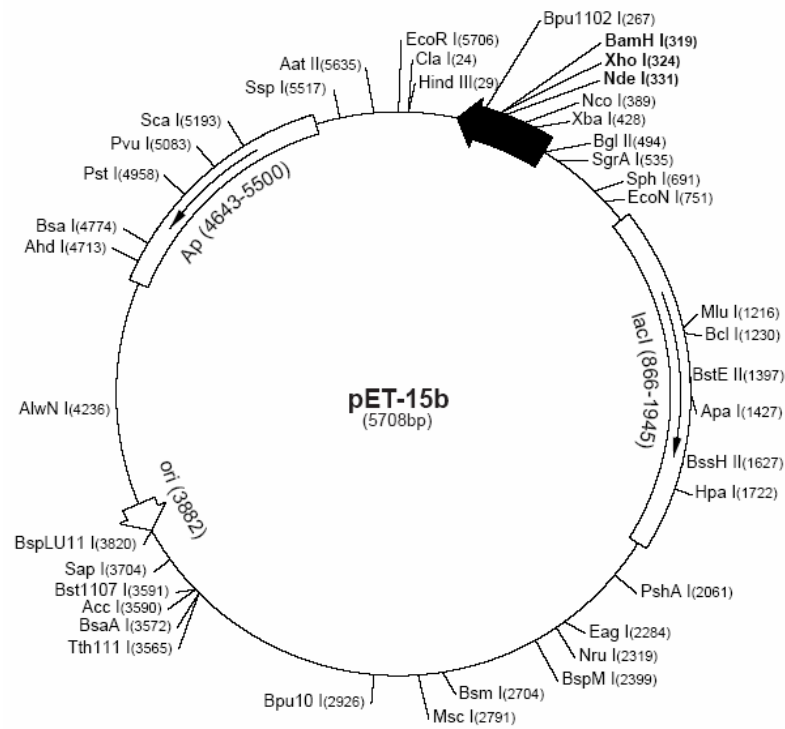
9.3. Vektorkarten



RNAi-Klonierungsvektor pHANNIBAL



Binärer Vektor pART27



Expressionsvektor pET-15b

Veröffentlichungen

Hücherig S., Behrens A., Petersen M. (2007) RNAi and overexpression transgenic *Coleus blumei* Hairy Roots for the validation of putative rosmarinic acid biosynthesis. 125 Years Deutsche Botanische Gesellschaft. Botanikertagung Hamburg. (Poster)

Hücherig S., Petersen M. (2009) RNAi und Überexpression in transgenen *Coleus blumei* Hairy Root-Kulturen zur Validierung von Genen der Rosmarinsäure-Biosynthese. 6. Treffen der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“ der Deutschen Botanischen Gesellschaft. Bonifatiushaus, Fulda. (Vortrag)

Petersen M., Abdullah Y., Benner J., Eberle D., Gehlen K., Hücherig S., Janiak V., Kim K.H., Sander M., Weitzel C., Wolters S. (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15-16):1663-1679

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Maike Petersen danke ich herzlich für die Bereitstellung des Forschungsthemas und ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Frau Dr. Elisabeth Fuß möchte ich für ihre bereitwillige Übernahme der Zweitkorrektur und die kleinen Hilfestellungen die sie während der Arbeit gegeben hat, danken.

Frau Anke Behrens danke ich für die einführenden Experimente mit *Agrobacterium rhizogenes* und der Bereitstellung einer Teilklonierung des HPPR-RNAi-Konstrukts.

Den Kollegen meiner Arbeitsgruppe möchte ich für eine anregende Zeit im Arbeitsalltag danken und für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Besonders Corinna Weitzel hat über eine schwierige Anfangszeit hinweggeholfen und mir bis heute den Aufenthalt in Marburg angenehm gemacht. Auch Kirstin Möller, Anja Preuß und Stefan Wolters waren mir mehr als Kollegen und ich danke ihnen für ihre Zusammenarbeit im Labor und für die gemeinsam verbrachte Freizeit.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mich bei der Wahl meiner Ausbildung und immer unterstützt und ermutigt haben, für ihr offenes Ohr bei Problemen und ihre Besuche in Marburg.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„RNAi-Untersuchungen und Überexpression von Genen der Rosmarinsäurebiosynthese“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14.12.2009

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephanie Hücherig
Geburtsdatum: 2. Januar 1979
Geburtsort: Hof
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1985–1989 Grundschule Neuried
1989–1991 Gymnasium München Fürstenried-West
1991–1998 Josef-Effner-Gymnasium Dachau

1998 Schulabschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1998–2004 Studium der Biologie an der Technischen Universität München

2004 Abschluss als Diplom-Biologin

Berufliche Tätigkeiten

April 2005–Okt. 2005 Ehrenamtliche Tätigkeit in der Wissenschaftlichen Abteilung des Botanischen Gartens München

Nov 2005–Jan 2006 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. Dr. Dario Leister (Botanik)

März 2006–Jan 2010 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. Maike Petersen